

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

JUSSARA PETERS SCHEFFER

**TERAPIA CELULAR NO REMODELAMENTO E FUNÇÃO
MIOCÁRDICA EM MINI PORCO**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – R.J.

ABRIL DE 2013

JUSSARA PETERS SCHEFFER

**TERAPIA CELULAR NO REMODELAMENTO E FUNÇÃO
MIOCÁRDICA EM MINI PORCO**

Dissertação de mestrado apresentado ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Baptista de Carvalho

Co-orientador: Prof. Dr. André Lacerda de Abreu Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – R.J.

ABRIL DE 2013

JUSSARA PETERS SCHEFFER

**TERAPIA CELULAR NO REMODELAMENTO E FUNÇÃO
MIOCÁRDICA EM MINI PORCO.**

Dissertação de mestrado apresentado ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Sanidade Animal.

BANCA EXAMINADORA

Doutora Melissa Markoski (Doutora, Ciências Biológicas Biologia Celular e Molecular – UFRGS, Pesquisadora Instituto de Cardiologia de Porto Alegre)

Doutor Cláudio Baptista de Carvalho (Doutor, Escola Superior de Medicina Veterinária pelo Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover - Alemanha, Professor visitante – UENF)

Doutor André Lacerda de Abreu Oliveira (Doutor, Medicina- Cirurgia Geral – UFRJ, Professor associado – UENF)

Doutor Leonardo Serafim da Silveira (Doutor, Produção animal – UENF, Professor associado – UENF)

Aos meus pais,
Adilson Scheffer e Maria de Lourdes Peters,
por tornarem possível a realização desse sonho.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Adilson Scheffer e Maria de Lourdes Peters, pois apesar da distância, da falta de atenção, da ausência nos momentos difíceis, sempre estiveram ao meu lado, me dando força, me jogando para cima. Nunca me deixaram desistir, amo vocês!

Ao meu pai devo agradecer pelo exemplo de honestidade, de força de vontade, por me mostrar que tudo é possível, pelos conselhos, no fundo você é o grande idealizador desse sonho! Obrigada por acreditar em mim, no meu sonho! “Meu pai, meu amigo, fiel, companheiro. Exemplo verdadeiro para mim.” (Meu pai, meu amigo – Cristina Mel)

A minha mãe, meu exemplo de garra, de força, mulher de fibra, pessoa que nunca demonstra tristeza e que esta sempre pronta a ajudar. Não sei como seria se você não estivesse sempre ao meu lado. Obrigada pelas mensagens de amor e carinho, que sempre chegam quando mais preciso! “ Maria, Maria, é o som, é a cor, é o suor. É a dose mais forte e lenta. De uma gente que ri quando deve chorar. E não vive, apenas aguenta.” (Maria, Maria – Milton Nascimento).

Ao meu irmão Pedro, por entender minha ausência, pelo apoio, pelo amor, e por estar presente na vida de meus pais. Saiba que mesmo com a distância o amor entre nós sempre existirá.

A minha irmã de coração Cássia, por apoiar minha mãe quando estou ausente, por me dar forças, por nunca desistir de nossa amizade, por atender aos meus telefonemas nos momentos difíceis, nos momentos de tristeza. Amo você!

As minhas avós Maria de Lourdes Peters (in memoriam) e Maria de Lourdes de Almeida Scheffer (in memoriam), pois tenho certeza de que estão sempre olhando por mim.

Aos meus familiares, tios, tias, madrinha e padrinho, agradeço pelos exemplos de vida, de caráter, pois a família é a base de tudo!

A minha amiga e colega de profissão Naila Colpo, agradeço pelos momentos de alegria, pelas risadas, pelas broncas, pelo apoio e por me auxiliar nas cirurgias sempre que precisei. Parabéns pela escolha da profissão e conte sempre comigo!

Ao Yuri Monteiro Leite, pelo amor, pela companhia, por não me deixar desistir nunca, e principalmente pela paciência nesses últimos meses, muito obrigada! Você é muito importante!

Ao casal de amigos maravilhosos André Gimenes e Amanda Rocha, agradeço pela sincera amizade, pelas conversas, pelo apoio, meus primeiros amigos nessa cidade, amigos eternos. Amo vocês! (e sim Amanda, eu estou chorando enquanto escrevo kkk). Ao André Gimenes agradeço pela grande ajuda no experimento, por anestesiar com seriedade e carinho todos os animais.

Aos meus grandes amigos “Felipao” (Antônio Felipe) e Guilherme Monteiro, por estarem sempre ao meu lado, por me mostrarem sempre o lado bom dos problemas, a luz no fim do túnel. Vocês são exemplos de vida!

Aos amigos do Hospital Veterinário Estrada Real (Juiz de Fora) pelas oportunidades, pelos ensinamentos, muito obrigada!

Aos amigos de equipe Livia, Renato, Mônica, Daniela e Giseli, agradeço pela companhia, pela ajuda no experimento. Sabemos como é difícil estar aqui, por isso a importância de sermos uma equipe.

Ao professor Claudio Baptista, que mesmo sem me conhecer, acreditou que eu seria capaz.

Ao professor André Lacerda, pela confiança, pelas oportunidades de trabalho, pela sua disponibilidade, pelo acompanhamento exercido durante a execução do trabalho e pela grande amizade construída ao longo desse tempo. Agradeço por acreditar no meu esforço, na minha dedicação a pesquisa.

Aos amigos “Uenfianos” que conquistei ao longo desse tempo, Gabriel, Priscila, professora Fernanda, Guilherme, Lucas, Vitor, Kenas, Daniel, Felipp, Andrea, Flávia, Alexandra, Gisele, Danizinha, Fábio, pela companhia, pelas risadas, pela ajuda com os porquinhos!

Aos meus filhos de quatro patas (Tina, Taty, Lilica, Miuchi, Daiana, Rajado, Branquinho, Kirk, Toy, Lindinha, Morena, Jiló, Mel, Farol, Tabica, e vários outros que já passaram em minha vida), pois eles são os principais responsáveis pela escolha da minha profissão. Devo agradecer principalmente a Tina minha primeira cadelinha, estive ao meu lado durante 18 anos, ao Tooddy pela companhia, pelo amor incondicional, por cuidar de mim, e a Nina pelo carinho, por alegrar meus dias, eles que estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis, muitas vezes aguentaram meu mau humor e falta de paciência, sem reclamar ou brigar. Agradeço ao mais novo filho, Scoth, pela alegria e pela capacidade de me deixar sem paciência!

Aos funcionários do Hospital Veterinário da UENF, pela alegria, pela ajuda em nosso trabalho.

Agradeço ao Instituto de Cardiologia de Porto Alegre pela grande oportunidade de trabalhar nesse projeto, pela parceria. A pesquisadora Melissa Markoski pelos ensinamentos na área, por estar disponível sempre que precisei!

Por último, com muito respeito, agradeço aos animais utilizados nos experimentos, aos queridos mini pigs, que convivi diariamente durante 18 meses, que tornaram possíveis esses resultados e que com inocência sacrificam suas vidas pela ciência. Obrigada pela doação silenciosa!

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

O aumento progressivo na prevalência e incidência das doenças cardiovasculares representa um problema de saúde pública de interesse crescente. Hoje a área das doenças cardiovasculares é a mais estudada quanto ao potencial terapêutico das células tronco, principalmente em pacientes com infarto agudo do miocárdio. A terapia celular inclui um conjunto de técnicas que visa a utilização de células tronco com finalidade terapêutica, podendo ainda ser combinada com outras estratégias terapêuticas. Células tronco são células indiferenciadas capazes de se multiplicar, quando extraídas de tecido adiposo são classificadas como células tronco mesenquimais adiposo derivadas. Utilizou-se modelo experimental mini porco MinipigBr1 divididos em dois grupos, controle e tratado. O grupo controle composto de 8 animais e o grupo tratado de 7 animais. Os animais foram submetidos a um modelo de miocardiopatia isquêmica através da ligadura do ramo diagonal da coronária paraconal (em humanos a coronária descendente anterior), reproduzindo fidedignamente o infarto agudo do miocárdio. Após a indução do infarto o grupo tratado recebeu células tronco mesenquimais adiposo derivadas, enquanto o grupo controle recebeu apenas solução fisiológica estéril. Os animais de ambos os grupos foram submetidos ao procedimento de eutanásia trinta dias após instituída a terapia. Através do exame ecocardiográfico avaliou-se a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, diâmetro sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo e área acinética, em três momentos: pré operatório, pós operatório imediato e momentos antes da eutanásia. Apesar dos resultados obtidos não terem sido estatisticamente significativos, observamos uma diferença entre o grupo tratado e o grupo controle, tanto nos resultados do exame de ecocardiografia quanto no exame histopatológico. Ou seja, uma diferença em termos estruturais e funcionais entre os grupos, representando uma melhora no grupo tratado. Concluímos que o modelo de miocardiopatia isquêmica foi eficaz na indução da isquemia, e que o transplante de células tronco mesenquimais adiposo derivada no miocárdio infartado promoveu uma melhora funcional do órgão.

Palavras – chave: Miocardiopatia, células tronco, mini porco.

ABSTRACT

The progressive increase in the prevalence and incidence of cardiovascular disease is a public health problem of growing interest. The area of cardiovascular disease is now the most studied regarding the therapeutic potential of stem cells, especially in patients with acute myocardial infarction. Cell therapy includes a set of techniques aimed at the use of stem cells for therapeutic purposes, and may also be combined with other therapeutic strategies. Stem cells are undifferentiated cells capable of multiplying. When extracted from adipose tissue, they are classified as adipose-derived mesenchymal stem cells. We used an experimental model mini pig MinipigBr1 divided into two groups, control and treated. The control group consisted of 8 animals and treated group have 7 animals. The animals were subjected to a model of ischemic cardiomyopathy by ligation of the major diagonal coronary paraconal, faithfully reproducing the acute myocardial infarction. The treatment group received adipose-derived mesenchymal stem cells after induction of myocardial infarction, while the control group received only sterile saline. The animals of both groups were subjected to euthanasia procedure thirty days after therapy instituted. Through the echocardiographic examination evaluated the ejection fraction of the left ventricle systolic diameter and left ventricular diastolic and akinetic area in three stages, preoperative, immediate postoperative and before euthanasia. Although the results were not statistically significant, we observed a difference between the treated group and the control group in both the results of the echocardiogram as the histopathology. That is, a difference in structural and functional terms between the two groups, representing an improvement in the treated group. We conclude that the model of ischemic cardiomyopathy was effective in inducing ischemia and that transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium promoted functional improvement of the organ.

Key-words: Cardiomyopathy, stem cells, mini pigs

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Coração de mini porco. Note-se local onde foi realizada a ligadura do ramo diagonal da coronária paraconal (seta) e abaixo desse local área de isquemia do miocárdio (círculo). Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012..... **24**
- Figura 2.** Coração de mini porco. Note-se a presença de área hiperêmica (indicada pelo círculo) próxima ao local onde foi realizada a ligadura do ramo diagonal da coronária (seta). Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012..... **25**
- Figura 3.** Pocilga. Note-se local amplo, arejado, com boa iluminação onde os animais foram mantidos durante todo o experimento. Unidade de Experimentação Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro /UENF, 2012..... **34**
- Figura 4.** Baía. Animais em recuperação anestésica após procedimento cirúrgico. Unidade de Experimentação Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro /UENF, 2012..... **35**
- Figura 5.** Orelha de mini porco. Local da canulação da veia auricular (seta), para posterior aplicação de anestésico. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012..... **36**
- Figura 6.** Mini porco anestesiado. Animal após entubação endotraqueal, tubo endotraqueal acoplado ao aparelho de anestesia inalatória. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012..... **36**
- Figura 7.** Mini porco em decúbito lateral direito. Incisão de pele com auxílio de bisturi elétrico, no 5º espaço intercostal esquerdo, para acesso ao coração. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012..... **37**

Figura 8. Tórax de mini porco. Exposição do coração com auxílio de um afastador de Finocheto, após toracotomia esquerda. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	38
Figura 9. Coração de mini porco. Início do procedimento de ligadura do ramo diagonal da coronária paraconal com fio prolene 6-0. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	38
Figura 10. Coração de mini porco. Final do procedimento de ligadura do ramo diagonal da coronária paraconal com fio prolene 6-0. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	39
Figura 11. Coração de mini porco. Ligadura do ramo diagonal da coronária paraconal com fio prolene 6-0. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	39
Figura 12. Mini porco. Animal em decúbito lateral direito, local da sutura após toracotomia esquerda no 5º espaço intercostal esquerdo (círculo). Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	40
Figura 13. Mini porco. Sequência do procedimento de coleta do tecido adiposo. (A) Divulsão da pele; (B) Elevação da pele, exposição do tecido adiposo; (C) Remoção do tecido adiposo; (D) Sutura na região da coleta. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	41
Figura 14. Tecido adiposo submentoniano de mini porco. Fragmentos de tecido adiposo submentoniano após procedimento de coleta. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	42

Figura 15. Tecido adiposo submentoniano de mini porco. Fragmento de tecido adiposo acondicionado em tudo Falcon contendo meio DMEM. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	42
Figura 16. Coração de mini porco. Momento da aplicação da terapia celular, ao redor do local onde foi realizada a oclusão da coronária, com auxílio de agulha Butterfly 25F acoplada a seringa de 3 ml. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	42
Figura 17. Exame ecocardiográfico em mini porco. Realização do exame de ecocardiografia, animal sob efeito de anestesia endovenosa, em decúbito lateral direito. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.....	45
Figura 18. Corte histológico do coração de mini porco. Miocardiócitos com degeneração hidrópica porém viáveis (seta). Na parte inferior da figura presença de congestão (círculo), parte do processo cicatricial. Coloração hematoxilina-eosina em aumento de 40X. Setor de Morfologia do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal/UENF, 2012.....	46
Figura 19. Corte histológico do coração de mini porco. Degeneração hidrópica difusa leve (seta), moderada na região pericárdica e endocárdio (seta azul). Processo inflamatório mononuclear difuso moderado. Infiltrado gorduroso difuso leve. Congestão vascular difusa leve. Foco de necrose na região de endocárdio (círculo). Coloração hematoxilina-eosina em aumento de 40X. Setor de Morfologia do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal/UENF, 2012.....	47
Figura 20. Coração de mini porco. Coração no momento da coleta após procedimento de eutanásia. Presença de aderência do pericárdio (seta amarela). Setor de Morfologia do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal/UENF, 2012.....	47

Figura 21. Gráfico da relação entre dos coeficientes de variação das quatro variáveis. Sendo X1 fração de ejeção; X2 diâmetro do sistólico ventrículo esquerdo; X3 diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo e X4 área acinética....	55
Figura 22. Gráfico ilustrando a comparação entre as médias da variável fração de ejeção dos grupos controle e tratado, nos 3 tratamentos.....	57
Figura 23. Gráfico ilustrando a comparação entre as médias da variável fração de ejeção dos grupos controle e tratado, nos 3 tratamentos.....	58
Figura 24. Gráfico ilustrando a comparação entre as médias da variável fração de ejeção dos grupos controle e tratado, nos 3 tratamentos.....	60
Figura 25. Gráfico ilustrando a comparação entre as médias da variável fração de ejeção dos grupos controle e tratado, nos 3 tratamentos.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela com o tempo cirúrgico de cada individuo do grupo controle e a média dos tempos.....	51
Tabela 2: Tabela com o tempo cirúrgico de cada individuo do grupo tratado com células tronco mesenquimais adiposo derivadas e a média dos tempos.....	51
Tabela 3: Resumo do teste de análise de variância (ANOVA), comparando os dois grupos (controle/ tratado) com os tratamento (períodos pré operatório, pós operatório imediato e pós 30 dias) e as três variáveis (fração de ejeção, diâmetro diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo).....	52
Tabela 4: Resumo do teste de análise de variância (ANOVA), comparando os dois grupos (controle/ tratado) com os tratamento (períodos: pré operatório, pós operatório imediato e pós 30 dias) e a quarta variância (área acinética).....	54
Tabela 5: Médias da fração de ejeção em dois grupos de animais (controle/tratamento) em diferentes períodos de avaliação.....	56
Tabela 6: Médias dos diâmetros sistólicos do ventrículo esquerdo em dois grupos de animais (controle/tratamento) em diferentes períodos de avaliação...	58
Tabela 7: Médias dos diâmetros diastólicos do ventrículo esquerdo em dois grupos de animais (controle/tratamento) em diferentes períodos de avaliação...	59
Tabela 8: Médias das áreas acinéticas em dois grupos de animais (controle/tratamento) em diferentes períodos de avaliação.....	60
Tabela 9: Porcentagem da presença de degeneração hidrópica difusa em cada corte histológico de acordo com cada grau de severidade, sendo leve, moderado e severo.....	62

Tabela 10: Porcentagem da presença de processo inflamatório difuso em cada corte histológico de acordo com cada grau de severidade, sendo leve, moderado e severo..... **63**

Tabela 11: Porcentagem da presença de necrose tecidual em cada corte histológico sendo classificado em focal ou difuso..... **64**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 JUSTIFICATIVA	19
1.2 OBJETIVO	20
1.2.1 Objetivos gerais	20
1.2.2 Objetivos específicos	20
2. REVISÃO LITERÁRIA	21
2.1 HISTÓRICO	21
2.2 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO	23
2.3 CÉLULAS TRONCO.....	26
2.3.1 Conceitos e classificação	26
2.3.2 Células tronco mesenquimais	28
2.4 TERAPIA CELULAR.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 DELINEAMENTO	34
3.2 ANIMAIS	34
3.3 PROTOCOLO ANESTÉSICO	35
3.4 MODELO DE MIOCARDIOPATIA ISQUÊMICA	37
3.5 PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ADIPOSEO DERIVADAS.....	40
3.6 PROTOCOLO DE TERAPIA CELULAR.....	43
3.7 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA	44
3.8 EUTANÁSIA	45
3.9 AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS	46
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5. COMITÊ DE ÉTICA	49
6. RESULTADOS	50
6.1 TEMPO CIRURGICO.....	51
6.2 AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA.....	51
6.2.1 Análise de variância	52
6.2.2 Teste de Duncam	55
6.2.2.1 Variável fração de ejeção	56

6.2.2.2 Variável diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo.....	57
6.2.2.3 Variável diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.....	59
6.2.2.4 Variável área acinética.....	60
6.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	61
6.3.1 Degeneração hidrópica difusa.....	62
6.3.2 Processo inflamatório difuso.....	63
6.3.3 Necrose tecidual.....	64
7. DISCUSSÃO	66
8. CONCLUSÃO.....	74
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXO.....	81

1 INTRODUÇÃO

O aumento progressivo na prevalência e incidência das doenças cardiovasculares representa um problema de saúde pública de interesse crescente. Segundo dados do Atlas de Doenças Cardíacas e Derrames, da Organização Mundial da Saúde, o Brasil é o 9º colocado entre os países cuja população morre mais, em números absolutos, devido a doenças cardíacas. As terapias atualmente disponíveis melhoraram grandemente o prognóstico dos pacientes cardiopatas, mas muitas vezes são paliativas. O infarto agudo do miocárdio (IAM) representa a principal afecção deste conjunto de doenças a serem estudadas com o objetivo de se obter resolução.

Os tratamentos farmacológico, intervencionista e cirúrgico da miocardiopatia isquêmica têm algumas limitações, sendo incapazes de impedir a perda de cardiomiócitos e a fibrose que, conseqüentemente, se estabelece de forma irreversível após um episódio isquêmico. Uma terapia ideal minimizaria a perda de cardiomiócitos, promoveria o retorno da função de miocárdio hibernante (regiões ventriculares desprovidas, reversivelmente, de capacidade contrátil) para um nível normal, estimularia a revascularização de zonas isquêmicas pela angiogênese e criaria novos cardiomiócitos, para repor aqueles perdidos após a injúria inicial. A terapia celular para promoção de angiogênese miocárdica surge, assim, como uma atraente alternativa terapêutica, tanto nas formas agudas como nas crônicas de isquemia.

A terapia celular inclui um conjunto de técnicas que visam a utilização de células tronco com finalidade terapêutica, podendo ainda ser combinada com outras estratégias terapêuticas utilizando medicamentos convencionais, procedimentos cirúrgicos ou fisioterapêuticos, com ação complementar ou potencializadora de tratamentos convencionais. Quando extraídas de tecido adiposo são classificadas como células tronco mesenquimais adiposo derivadas.

Estudos pré-clínicos são mais frequentemente realizados com ratos ou camundongos, e apenas eventualmente com animais de maior porte como o cão (KALIL et al., 2002). Nas últimas décadas, foi desenvolvido o mini porco, espécie de

1 suíno da linhagem Minipig Br1, produzidos no Brasil pela empresa Minipig Pesquisa
2 e Desenvolvimento como alternativa para modelos pré-clínicos, combinando uma
3 anatomia mais apropriada para comparação com a espécie humana com a facilidade
4 de manutenção já que é um animal de produção (MARIANO, 2003).

5 Estudos que utilizaram células tronco por via de administração
6 intracoronariana tiveram resultados modestos, enquanto estudos que fizeram a
7 aplicação direta, intramiocárdica, mostraram bons resultados, ainda que sua
8 interpretação permaneça limitada pela pequena amostragem e ausência de grupo
9 controle nos estudos (ZUK, 2010).

10 Com esta pesquisa busca-se revisar estudos, a fim de demonstrar que a
11 terapia celular utilizando células tronco mesenquimais adiposo derivada é um
12 tratamento inovador e com perspectiva de contribuição para o tratamento de
13 pacientes com infarto agudo do miocárdio.

14 A hipótese é que a terapia celular represente uma alternativa viável para o
15 tratamento da isquemia miocárdica, auxiliando na revascularização do miocárdio e
16 sua recuperação funcional.

17

18 **1.1 JUSTIFICATIVA**

19

20 As doenças arteriais são as principais causas de morte no mundo. Apesar do
21 avanço no tratamento farmacológico, intervencionista e cirúrgico ao redor de 12%
22 dos pacientes com esta doença não são passíveis de revascularização por técnicas
23 convencionais. Esta impossibilidade determina prejuízo sintomático e alterações
24 que, se mantidas de uma forma crônica, evoluem para perda de miocárdio
25 funcionante e possível evolução para insuficiência cardíaca e morte.

26 O avanço na compreensão da base molecular da formação de novos vasos,
27 isto é, angiogênese, permitiu que fossem criadas estratégias terapêuticas baseadas
28 na utilização de terapia celular, visando recuperar a perfusão do miocárdio
29 isquêmico.

1 **1.2 OBJETIVOS**

2

3 **1.2.1 OBJETIVOS GERAIS**

4

5 Avaliação da capacidade funcional do miocárdio através do emprego da
6 terapia celular em mini porcos com infarto do miocárdio cirurgicamente induzidos.

7

8 **1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

9

10 1. Avaliar a segurança e viabilidade de um ensaio pré-clínico de terapia
11 celular para revascularização miocárdica.

12 2. Avaliar os efeitos da terapia celular utilizando células tronco mesenquimais
13 adiposo derivadas sobre a função miocárdica por meio de ecocardiograma.

14 3. Avaliar os efeitos desta mesma terapia celular sobre a morfologia dos
15 vasos e do tecido miocárdico através de análise histológicas.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A partir do seu surgimento nos anos sessenta, a terapia celular chegou a seu primeiro ensaio clínico em 1990. Hoje, conforme o *Journal of Gene Medicine* estão em andamento um total de 1537 ensaios clínicos. No Brasil, apesar de constituir-se em área ainda incipiente, a terapia celular envolve vários grupos de pesquisa. Necessita, entretanto, de apoio substancial para induzir seu desenvolvimento e inserção do país no cenário internacional (RAUBER; DALMAZ, 2006; ANGELI; OLIVEIRA, 2007).

Uma das causas mais frequentes de insuficiência cardíaca é a cardiomiopatia isquêmica, sendo este um mal epidêmico neste início de século, afetando de 2 a 4 milhões de pessoas nos Estados Unidos da América (EUA), cerca de 15 milhões de pessoas ao redor do planeta (HONOLD et al., 2004; LEITE; DOHMANN, 2004), causando 7,2 milhões de mortes ao ano no mundo (MOZID et al., 2011). As doenças cardiovasculares representam uma das principais causas de morte em países desenvolvidos e em desenvolvimento, como no Brasil, onde 30% dos óbitos são causados por essa doença (RAUBER; DALMAZ, 2006; ANGELI; OLIVEIRA, 2007). Por ano mais de 400.000 internações são decorrentes de insuficiência cardíaca, ou comorbidades associadas, como hipertensão, diabetes e obesidade, sendo considerada a quarta maior causa de internação hospitalar (LEITE; DOHMANN, 2004; DOHMANN et al., 2005), gerando gastos financeiros superiores a R\$150 milhões/ano para Sistema Único de Saúde (SUS). Dados indicam mortalidade hospitalar em torno de 6,39% ao ano devido a insuficiência cardíaca (KALIL; SANT'ANNA, 2004; LEITE; DOHMANN, 2004; OKAMOTO; CAMPOS, 2004).

Nas últimas duas décadas ocorreram importantes avanços no tratamento das doenças cardiovasculares (BOCCHI; FERREIRA, 2005; RAUBER; DALMAZ, 2006; PALPANT; METZGER, 2010). Nos últimos anos a medicina cardiovascular, com base em estudos pré-clínicos e clínicos, passou a acreditar na hipótese de que o tecido cardíaco lesado poderia ser reparado com a utilização da terapia gênica e da

1 terapia celular, tendo conseqüente neovascularização e formação de novos
2 cardiomiócitos, promovendo uma melhor recuperação após isquemia aguda e reparo
3 de doenças crônicas do miocárdio (HONOLD et al., 2004; ANGELI; OLIVEIRA,
4 2007). Diversas propostas de opções terapêuticas clínicas e cirúrgicas vêm sendo
5 desenvolvidas nas últimas décadas, porém todas as propostas têm o principal
6 objetivo de tratar apenas as conseqüências do infarto do miocárdio, e não tratar a
7 causa base, que seria a perda da célula contrátil, ou seja, o cardiomiócito. Desta
8 forma, a terapia celular é sugerida como terapia regenerativa do tecido lesado,
9 tratando a perda do cardiomiócito (HONOLD et al., 2004; BOCCHI; FERREIRA,
10 2005; GUARITA-SOUZA et al., 2005).

11 Foi publicado na Alemanha em 2001 o primeiro caso de transplante autólogo
12 de célula tronco para reparo do miocárdio em humano, onde após 10 semanas do
13 transplante ocorreu o remodelamento do músculo cardíaco lesado (DOHMANN,
14 2004; RAUBER; DALMAZ, 2006). Desde então, vários casos foram descritos e
15 várias pesquisas foram iniciadas. Os maiores estudos de terapia celular em doenças
16 cardiovasculares ocorrem no *Texas Heart Institute*. No Brasil, em 2005, o Ministério
17 da Saúde anunciou um investimento de aproximadamente R\$13 milhões para
18 pesquisas na área de tratamentos de doenças cardiovasculares, incluindo terapia
19 gênica (OKAMOTO; CAMPOS, 2004; RAUBER; DALMAZ, 2006).

20 Apesar dos inúmeros casos já publicados demonstrando a eficácia dessa
21 terapia nas doenças cardiovasculares, muitas são as perguntas a serem
22 respondidas antes que possa ser plenamente compreendida, só então, aceita ou
23 descartada como opção de tratamento, sendo importante a realização de novas
24 pesquisas (KALIL; SANT'ANNA, 2004; ANGELI; OLIVEIRA, 2007; ZUK, 2010). Por
25 isso a importância do uso de modelos animais bem definidos e que possam
26 apresentar situações pato-fisiológicas humanas. Destacando-se então a utilização
27 do modelo experimental mini porco, devido a sua semelhança com a bioquímica, a
28 morfologia e a fisiologia cardiovascular com a espécie humana (MARIANO, 2003).

29

30

31

2.2 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

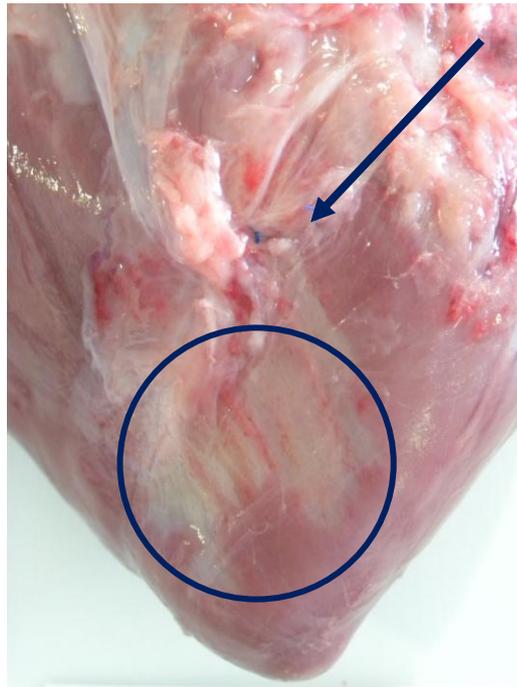
São várias as doenças que podem afetar o bom funcionamento do músculo cardíaco: coronariopatias, doença de Chagas, miocardiopatias, sendo a causa mais comum, o infarto agudo do miocárdio (ANGELI; OLIVEIRA, 2007; BUDLOWSKI, 2009). O termo infarto agudo do miocárdio significa a morte de cardiomiócitos causada por isquemia prolongada, devido à oclusão de uma ou mais artérias coronárias responsáveis pela irrigação sanguínea do músculo cardíaco (RAUBER; DALMAZ, 2006; OLIVEIRA; CAMPOS, 2009; PALPANT; METZGER, 2010), impedindo o fluxo de sangue para a região do coração distal ao local de oclusão (Figura 1) (PALPANT; METZGER, 2010). Como consequência do infarto, ocorre a perda irreversível de cardiomiócitos e células epiteliais, comprometendo a função cardíaca do indivíduo (OLIVEIRA; CAMPOS, 2009; MOZID et al., 2011). Várias áreas do miocárdio são afetadas, apresentando uma resposta e gravidade diferente, de acordo com a intensidade e duração do evento isquêmico, podendo levar a arritmias e até a falência cardíaca (OLIVEIRA; CAMPOS, 2009; PALPANT; METZGER, 2010).

Após o dano isquêmico ocorre uma intensa e indiscriminada perda celular, gerando uma liberação sistêmica e local de mediadores inflamatórios, que pode ser observada devido a presença de área hiperêmica próxima ao local de obstrução da coronária (Figura 2). A quantidade de mediadores liberada é proporcional à extensão da área lesada; eles são responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias para a região acometida, visando processo de reparação (HONOLD et al., 2004; RAUBER; DALMAZ, 2006; OLIVEIRA; CAMPOS, 2009). Os cardiomiócitos submetidos a um menor grau de isquemia sofrem morte celular por apoptose. Com a diminuição da inflamação aguda, ocorre o reparo a longo prazo e o processo de cicatrização (HONOLD et al., 2004; OLIVEIRA; CAMPOS, 2009). A presença de grande número de fibroblastos no local leva a deposição de colágeno e formação de áreas extensas de fibrose. Esse conjunto de eventos que ocorre após o dano isquêmico é chamado de remodelamento ventricular, que depois de instalado leva à diminuição da função ventricular esquerda (OLIVEIRA; CAMPOS, 2009). Na maioria das vezes os cardiomiócitos não se regeneram e a insuficiência cardíaca pode ser

1 uma das complicações (SOUZA et al., 2004; OLIVEIRA; CAMPOS, 2009). Alguns
2 autores classificam o coração como um órgão terminalmente diferenciado, ou seja,
3 possui capacidade limitada de regeneração tecidual (DANOVIZ et al., 2010;
4 PALPANT; METZGER, 2010).

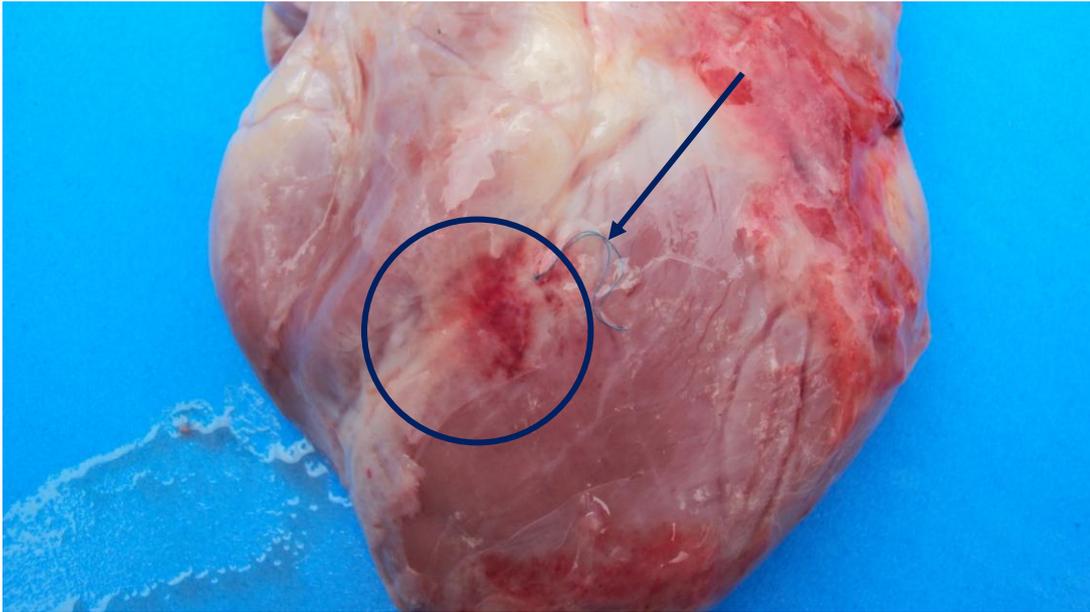
5

6



7

8 **Figura 1 - Coração de mini porco. Note-se local onde foi realizada a ligadura do ramo diagonal da coronária**
9 **paraconal (seta) e abaixo desse local área de isquemia do miocárdio (círculo). Setor de Clínica Cirúrgica de**
10 **Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.**



1

2

3

4

Figura 2- Coração de mini porco. Note-se a presença de área hiperêmica (indicada pelo círculo) próxima ao local onde foi realizada a ligadura ramo diagonal da coronária paraconal (seta). Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

Tratamentos farmacológicos não são eficazes para substituir a cicatriz miocárdica por cardiomiócitos contráteis, permitindo o desenvolvimento da insuficiência cardíaca. Novas pesquisas visam o emprego da terapia celular na cardiologia, por proporcionar multiplicação de cardiomiócitos funcionais e saudáveis, a angiogênese, controle da apoptose e fibrose e a modulação da resposta inflamatória, gerando uma regeneração bem sucedida do coração infartado, diminuindo os efeitos danosos do processo isquêmico (SOUZA et al., 2004; OLIVEIRA; CAMPOS, 2009).

14

15

16

17

18

19

20

1 2.3 CÉLULAS TRONCO

2

3 2.3.1 CONCEITOS E CLASSIFICAÇÃO

4

5 O termo células tronco, do inglês *stem cell*, diz respeito a células que
6 possuem características de autorrenovação, são indiferenciadas, com capacidade
7 de diferenciação em diversos tipos celulares e reconstituição funcional de
8 determinados tecidos (BOCCHI; FERREIRA, 2005; SOUZA et al., 2010; ZUK, 2010;
9 XIE et al., 2011). Podem dar origem a uma variedade de tipos teciduais como ossos,
10 tendões, cardiomiócitos, tecido adiposo, muscular, neuronal, entre outros (BOCCHI;
11 FERREIRA, 2005; ZUK, 2010

12 A classificação das células tronco é proposta de maneira diversificada por
13 muitos autores no mundo todo, a mais utilizada é aquela que classifica as células de
14 acordo com a sua potencialidade e do tipo de tecido do qual ela se origina. Podendo
15 ser classificadas em: 1) totipotentes; 2) pluripotentes; 3) multipotentes; 4)
16 oligopotentes e 5) unipotentes, que originam uma linhagem celular.

17 **Totipotentes:** células que, quando isoladas, são capazes de gerar por si só
18 outro indivíduo completo, incluindo os tecidos placentários. Ex: células embrionárias
19 na fase de mórula, quando o embrião é composto de 8 a 16 células.

20 **Pluripotentes:** capazes de se diferenciar em todos os tecidos do corpo
21 humano, exceto nos anexos embrionário, ou seja, podem dar origem a linhagens
22 dos 216 diferentes tipos de tecidos que formam o corpo humano. Ex: células
23 embrionárias na fase de blastocisto, com 72h. As células tronco pluripotentes são as
24 únicas capazes de se diferenciarem *in vitro*, de modo inerente e espontâneo, em
25 células das três linhagens germinativas.

26 **Multipotentes:** possuem potencial de diferenciação mais restrito, limitado a
27 apenas alguns tipos celulares. É encontrada em estágios posteriores do
28 desenvolvimento fetal e que persistem após o nascimento. Também chamadas de
29 células tronco adultas. Ex: células da medula óssea, do cordão umbilical e as células
30 tronco de tecido endotelial, adiposo, dentário, etc.

1 **Oligopotentes** : que se diferenciam em poucas células de um mesmo folheto
2 embrionário.

3 **Unipotentes**: capazes de gerar só um tipo de célula, responsáveis pela
4 regeneração de tecidos particulares. Exemplo: células da camada germinativa da
5 epiderme, eritroblastos, células do fundo das criptas de Liberkham no duodeno,
6 espermatozóides no testículo, etc.

7 Quando classificadas sob o ponto de vista morfológico, de origem, são
8 chamadas: 1) Embrionárias, que são células tronco totipotentes; 2) Células tronco
9 adultas ou somáticas, sendo pluripotentes (BOCCHI; FERREIRA, 2005; MOZID et
10 al., 2011).

11 **Embrionárias**: como o próprio nome diz, são aquelas isoladas do embrião.
12 Elas constituem a massa celular interna do blastocisto. O que estabelece seu
13 potencial de diferenciação é a fase em que se encontra o embrião quando as células
14 são isoladas. Por isso, quanto mais jovem o embrião, mais indiferenciadas serão
15 suas células.

16 **Adultas ou Somáticas**: são células multipotentes encontradas na medula
17 óssea, sangue de cordão umbilical, sangue periférico, polpa dentária, alguns órgãos
18 (ex. pâncreas e fígado) e diversos outros tecidos do corpo humano (ex. tecido
19 adiposo, pele, etc.). Células tronco adultas estão presentes em todos os tecidos do
20 organismo, incluindo o tecido nervoso, as quais têm a função de repor as células
21 lesionadas ou que se degeneram durante a vida do indivíduo. Nos tecidos, essas
22 células estão, localizadas em sítios específicos, chamados “nichos”, que são
23 diferentes para cada tipo de tecido, porém geralmente se encontram aderidos à
24 membrana basal em áreas protegidas (CHA; FALANGA, 2007).

25 Com o uso de células tronco provenientes de diferentes fontes, têm sido
26 possível reverter quadros patológicos que antes eram considerados irreversíveis,
27 mostrando efeitos benéficos no desempenho ventricular após infarto do miocárdio
28 (KALIL et al., 2002; RAUBER; DALMAZ, 2006).

29 O uso das células tronco embrionárias (pluripotentes) para certas doenças e
30 terapias celulares é enorme, porém, envolve diversas questões éticas,
31 principalmente em relação ao embrião humano, e seu uso tem sido associado com a

1 formação de tumores (RAUBER; DALMAZ, 2006), mais especificamente, o teratoma.
2 Também há evidência da indução de tumores (sarcoma) pelas células tronco
3 mesenquimais implantadas em camundongo (XIE et al., 2011), por isso é necessário
4 um maior número de investigações a fim de evitar essa ocorrência. O fato da célula
5 tronco adulta ou do cordão umbilical poderem causar a formação de teratomas, ou
6 outros tipos de tecidos indesejados é pouco estudado, entretanto esta possibilidade
7 deve ser considerada caso seja utilizada a terapia com células tronco (SOUZA et al.,
8 2010).

9 As células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo são
10 especialmente atrativas devido a sua fácil obtenção em grandes quantidades em
11 uma única coleta, a grande frequência (0,5%) e a rápida expansão *in vitro*. Estas
12 células constituem uma população heterogênea e dependendo da fonte da qual são
13 obtidas apresentam diferentes expressões gênicas (SOUZA et al., 2010), por isso
14 nos últimos 3 anos tem recebido maior atenção das pesquisas do que as células
15 coletadas da medula óssea.

16

17 **2.3.2 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS**

18

19 As células tronco mesenquimais são de especial interesse na terapia celular
20 por apresentarem uma maneira relativamente mais simples de serem coletadas e
21 isoladas quando comparadas as demais. Além disso, possuem a plasticidade de
22 células multipotentes, com a capacidade de se diferenciarem em tecido ósseo,
23 cartilaginoso, adiposo, muscular, epitélio e, mais recentemente, neural (MONTEIRO
24 et al., 2009; MOZID et al., 2011), e capacidade de autorrenovação (BUDLOWSKI,
25 2009; OLIVEIRA; CAMPOS, 2009; ZUK, 2010), ou seja, são capazes de se
26 multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado (BUDLOWSKI, 2009) e estão
27 presentes em regiões perivasculares (MONTEIRO et al., 2009). Embora sua
28 capacidade de diferenciação seja mais limitada que as células tronco embrionárias,
29 elas apresentam algumas vantagens, como facilidade de isolamento, capacidade de
30 propagação em cultura e de não serem imunogênicas (BUDLOWSKI, 2009;
31 DANOVIK et al., 2010; MOZID et al., 2011).

1 Tradicionalmente são isoladas da medula óssea, porém em 2002 uma equipe
2 de pesquisas da Universidade da Califórnia, publicou um artigo onde caracterizou
3 uma nova linhagem de células tronco derivadas de tecido adiposo, classificadas
4 como células tronco mesenquimais adiposo derivadas (PALPANT; METZGER, 2010;
5 ZUK, 2010). O tecido adiposo é uma fonte abundante e facilmente disponível de
6 células tronco com propriedades adequadas a reparação tecidual (DANOVIZ et al.,
7 2010; XIE ET AL., 2011). Também são encontradas no cordão umbilical, tecido
8 sinovial (MONTEIRO et al., 2009; OLIVEIRA; CAMPOS, 2009; SOUZA et al., 2010),
9 periósteo, tecido muscular esquelético, órgãos parenquimatosos (MONTEIRO et al.,
10 2009), e com menor frequência, no sangue periférico de adultos. Ou seja, essa
11 linhagem de células tronco pode ser encontrada em quase todos os órgãos do corpo
12 (SOUZA et al., 2010). Possuem grande potencial de diferenciação em diversas
13 linhagens celulares, incluindo osteoblastos, adipócitos, hepatócitos, renais e
14 condrócitos (BOCCHI; FERREIRA, 2005; GUARITA-SOUZA et al., 2005; ANGELI;
15 OLIVEIRA, 2007; MONTEIRO et al., 2009; PALPANT; METZGER, 2010; SOUZA et
16 al., 2010, ZUK, 2010; XIE et al., 2011).

17 As células tronco mesenquimais possuem a característica de diferenciação
18 meio dependente, ou seja, adquirem as características das células com que estão
19 em contato (SOUZA et al., 2004; MOZID et al., 2011). Sua diferenciação em
20 cardiomiócitos tem sido observada em culturas específicas e após injeção em
21 miocárdio sadio ou isquêmico de animais (BOCCHI; FERREIRA, 2005; RAUBER;
22 DALMAZ, 2006; ANGELI; OLIVEIRA, 2007; OLIVEIRA; CAMPOS, 2009). Além do
23 seu potencial angiogênico (BOCCHI; FERREIRA, 2005; GUARITA-SOUZA et al.,
24 2005).

25 Em decorrência da facilidade em se dividir e proliferar, são células
26 responsáveis pela manutenção e renovação dos tecidos mesenquimais adultos,
27 incluindo o músculo cardíaco (OLIVEIRA; CAMPOS, 2009; SOUZA et al., 2010).
28 Esse tipo celular após entrar em contato com o tecido lesado desencadeia uma
29 sequência complexa de eventos, na tentativa de restaurar a integridade da área
30 lesada (DOHMANN et al., 2005; MONTEIRO et al., 2009).

31 O principal mecanismo é desencadeado após a aplicação no local da lesão,
32 momento em que as células iniciam a produção de fatores de crescimento

1 reparadores. Além disso, elas podem suprimir a inflamação local e repor células
2 danificadas (OLIVEIRA; CAMPOS, 2009; SOUZA et al., 2010). Por último, são
3 capazes de contribuir para a criação de um ambiente favorável ao reparo de tecido
4 cardíaco endógeno (SOUZA et al., 2004; SOUZA et al., 2010). Possuem capacidade
5 de se acumular ao redor de processos inflamatórios e tumorais, por isso podem ser
6 utilizadas como terapia regenerativa e terapia gênica, sendo alvo de pesquisas
7 também na área de oncologia e onco-hematologia (BOCCHI; FERREIRA, 2005;
8 ANGELI; OLIVEIRA, 2007; SOUZA et al., 2010). Estudos descrevem seu potencial
9 imunomodulador (MONTEIRO et al., 2009).

10 São três os mecanismos já estabelecidos através dos quais as células tronco
11 mesenquimais atuam no miocárdio: regeneração dos cardiomiócitos, vasculogênese
12 e efeito parácrino (HONOLD et al., 2004; MONTEIRO et al., 2009; SOUZA et al.,
13 2010; MOZID et al., 2011). Elas secretam uma variedade de citocinas e fatores de
14 crescimento que possuem tanto atividade parácrina quanto autócrina. Quando
15 injetadas no miocárdio isquêmico, proliferam-se e transdiferenciam-se em
16 cardiomiócitos ou fundem-se com os cardiomiócitos nativos a fim de regenerar o
17 miocárdio perdido (GUARITA-SOUZA et al., 2005; RAUBER; DALMAZ, 2006;
18 SOUZA et al., 2010). Reduzindo a área de fibrose no miocárdio isquêmico, após
19 infarto agudo do miocárdio (HONOLD et al., 2004; DOHMANN et al., 2005;
20 GUARITA-SOUZA et al., 2005), recuperando a função contrátil do ventrículo
21 (GUARITA-SOUZA et al., 2005).

22 Diversas variáveis influenciam nos resultados de estudos pré-clínicos e
23 clínicos, onde foram utilizadas as células tronco mesenquimais, tais como momento
24 da injeção das células, números de células injetadas e sítio de aplicação (SOUZA et
25 al., 2010; MAYORGA et al., 2009). Alguns estudos demonstram que a aplicação
26 precoce após um evento isquêmico resulta em melhores índices de fixação, ou seja,
27 quando mais agudo o processo isquêmico, ou quanto mais vascularizada a região
28 afetada, mais intensa e efetiva será a resposta das células tronco mesenquimais
29 (BOCCHI; FERREIRA, 2005; MONTEIRO et al., 2009).

30 As células tronco mesenquimais adiposo derivadas podem alterar a matriz
31 extracelular, resultando em efeitos favoráveis no remodelamento pós-infarto do
32 miocárdio. Promovem o decréscimo da fibrose e da apoptose, o que diminui a

1 dilatação ventricular esquerda, aumenta a espessura miocárdica e melhora a
2 contratilidade cardíaca, além de aumentar a densidade capilar, levando a uma
3 melhora na funcionalidade do órgão (SOUZA et al., 2004; RAUBER; DALMAZ, 2006;
4 OLIVEIRA; CAMPOS, 2009; SOUZA et al., 2010).

5 A administração das células tronco mesenquimais pode ser realizada pela via
6 intravenosa, intraperitoneal, intracoronariana ou intramiocárdica (DOHMANN et al.,
7 2005; SOUZA et al., 2010; MOZID et al., 2011). Segundo alguns autores a via
8 intravenosa é a menos invasiva, porém menos eficaz, considerando que seria
9 necessária várias aplicações para que a quantidade de células tronco na área
10 lesada fosse adequada, além da possibilidade de deposição em outros órgãos
11 (RAUBER; DALMAZ, 2006; SOUZA et al., 2010). Sendo assim, as vias intracardíaca
12 ou intramiocárdica e intracoronariana, por atingirem o local da lesão mais
13 rapidamente proporcionam melhor efeito (HONOLD et al., 2004; BOCCHI;
14 FERREIRA, 2005; OLIVEIRA; CAMPOS, 2009; SOUZA et al., 2010). A via
15 intracardíaca é preferida em casos de obstrução coronariana (miocardiopatia
16 isquêmica) (BOCCHI; FERREIRA, 2005; MOZID et al., 2011). A aplicação pela via
17 intracoronariana é similar a técnica de angioplastia coronariana (MOZID et al., 2011).

18 Alguns autores demonstraram a presença de oclusões microvasculares após
19 infusão das células tronco mesenquimais adiposo derivadas, associando o tamanho
20 das células ao risco de obstrução do fluxo (ANGELI; OLIVEIRA, 2007; SOUZA et al.,
21 2010). Ou seja, o próprio produto a ser injetado pode ser causa de
22 tromboembolismo, gerando uma segunda lesão isquêmica no miocárdio infartado
23 (ANGELI; OLIVEIRA, 2007; CAMPOS, 2009; SOUZA et al., 2010). Bocchi e Ferreira
24 (2005) relatam a ocorrência de formação de ilhotas de células com suprimento
25 sanguíneo limitado no miocárdio isquêmico, quando este recebe aplicação direta de
26 células tronco mesenquimais adiposo derivadas, podendo comprometer a sobrevivência
27 dessas células.

28

29

30

31

1 2.4 TERAPIA CELULAR

2

3 A terapia celular tem-se mostrado muito promissora como opção de
4 tratamento das doenças cardiovasculares agudas e crônicas (DOHMANN, 2004;
5 LEITE; DOHMANN, 2004; OKAMOTO; CAMPOS, 2004; RAUBER; DALMAZ, 2006;
6 OLIVEIRA; CAMPOS, 2009), para a reposição de células danificadas por células
7 cardíacas saudáveis e para a angiogênese, a fim de repor a perda celular (LEITE;
8 DOHMANN, 2004; OKAMOTO; CAMPOS, 2004; RAUBER; DALMAZ, 2006). Apesar
9 da incerteza em relação ao mecanismo pelo qual a terapia celular melhora a função
10 cardíaca e regenera a sua anatomia, a tradução dos achados obtidos em laboratório
11 para o cenário clínico vem ocorrendo aceleradamente (OKAMOTO; CAMPOS, 2004;
12 ANGELI; OLIVEIRA, 2007). Entretanto, devido a controvérsias políticas e éticas que
13 cercam o uso de células tronco embrionárias, os pesquisadores procuram direcionar
14 suas atenções em fontes de células tronco multipotentes pós-natais (KWAN et al.,
15 2007).

16 Após a realização dos vários estudos começam a aparecer os primeiros
17 resultados apontando a eficácia dessa terapia (GUARITA-SOUZA et al., 2005;
18 RAUBER; DALMAZ, 2006), onde pacientes apresentam melhora significativa dos
19 sintomas, da capacidade funcional e da função global do ventrículo esquerdo, nos
20 casos de infarto agudo do miocárdio (DOHMANN et al., 2005; GUARITA-SOUZA et
21 al., 2005), atenuando os danos causados ao coração em decorrência da inflamação,
22 isquemia, hipertensão ou doença arterial coronária, reduzindo a morbidade e
23 mortalidade (HONOLD et al., 2004; OKAMOTO; CAMPOS, 2004; PALPANT;
24 METZGER, 2010).

25 Essa terapia consiste na utilização de células tronco diretamente no foco de
26 lesão ou recrutadas a ele mediante estimulação da síntese de moléculas
27 quimiotáticas, buscando restaurar o funcionamento de tecidos e órgãos através da
28 proteção da integridade celular ou reposição de células danificadas por células
29 saudáveis, reparando a lesão inicial (OKAMOTO; CAMPOS, 2004; BOCCHI;
30 FERREIRA, 2005; BUDLOWSKI, 2009; OLIVEIRA; CAMPOS, 2009), reduzindo a
31 deposição de colágeno e formação de cicatriz (HONOLD et al., 2004).

1 Nos EUA, onde a legislação permite patentear linhagens celulares e
2 tecnologias que envolvam o uso de células tronco, já foram concedidas mais de
3 2.000 patentes relevantes para uso em doenças e há mais de 100 companhias que
4 detem patentes relacionadas ao uso de células tronco em humanos. Se algumas
5 destas linhagens patenteadas se tornar uma terapia, nos veremos na situação de ter
6 que pagar para utilizar estas células. Por outro lado, no Brasil a legislação não
7 permite patentear estas células, o que significa que qualquer terapia aqui gerada
8 seria gratuita para os pacientes (MENDEZ-OTERO et al. 2007).

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO

Ensaio experimental pré-clínico.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados mini porcos da linhagem Minipig Br1 (MARIANO, 2003), produzidos no Brasil pela empresa Minipig Pesquisa e Desenvolvimento. Os animais foram mantidos Unidade de Experimentação Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, com as condições de alimentação, iluminação e higiene preconizadas pelos produtores (Figura 3) e utilizados quando adultos com peso entre 60 e 70 kg (Figura 4).



Figura 3 - Pocilga. Note-se local amplo, arejado, com boa iluminação onde os animais foram mantidos durante todo o experimento. Unidade de Experimentação Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro /UENF, 2012.



1
2 **Figura 4 – Baia. Animais em recuperação anestésica após procedimento cirúrgico. Unidade de**
3 **Experimentação Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro /UENF, 2012.**

4 5 **3.3 PROTOCOLO ANESTÉSICO**

6
7 Cada um dos animais recebeu medicação pré anestésica com cloridrato de
8 acepromazina, na dose de $0,2\text{mg/kg}^{-1}$, pela via intramuscular.

9 Vinte minutos após a administração da medicação pré anestésica foi realizada
10 a cateterização da veia auricular pela introdução de cateter calibre 20 Gauge (24G)
11 (BD-Insyte-Becton Dickson ind. Cirurgicas –11 Ltda), após antissepsia da região
12 com álcool (Figura 5).

13 Por esta via procedeu-se a indução da anestesia com a combinação
14 propofol/tiopental sódico na proporção de 1:1, homogeneizados em seringa de 20
15 ml, administrados sobre a forma de dose efeito. Os animais permaneceram sob
16 anestesia com propofol + tiopental sódico durante o exame de ecocardiografia pré
17 cirúrgico. Isso se manteve até o momento cirúrgico.

18 Após o exame o animal foi colocado em decúbito dorsal, com auxílio de um
19 laringoscópio, realizou-se a intubação traqueal. Ao tubo endotraqueal foi acoplado o
20 sistema fechado de anestesia inalatória, por onde o animal recebeu o anestésico

- 1 isoflurano com oxigênio (Figura 6). Permaneceram sob anestesia inalatório até o
- 2 final do procedimento cirúrgico.



3

4 **Figura 5 – Orelha de mini porco. Local da canulação da veia auricular (seta), para posterior aplicação de**
5 **anestésico. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.**

6

7



8

9 **Figura 6 – Mini porco anestesiado. Animal após entubação endotraqueal, tubo endotraqueal acoplado ao**
10 **aparelho de anestesia inalatória. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital**
11 **Veterinário/UENF, 2012.**

12

13

1 3.4 MODELO DE MIOCARDIOPATIA ISQUÊMICA

2

3 Através de toracotomia esquerda na altura do 5º espaço intercostal esquerdo
4 (Figuras 7 e 8) induziu-se o infarto agudo do miocárdio através da ligadura do ramo
5 diagonal da coronária paraconal (em humanos a coronária descendente anterior)
6 com fio prolene 6-0 (Figuras 9, 10 e 11). A realização bem-sucedida do infarto foi
7 verificada pela observação do desenvolvimento de uma cor pálida no miocárdio
8 correspondente.

9

10

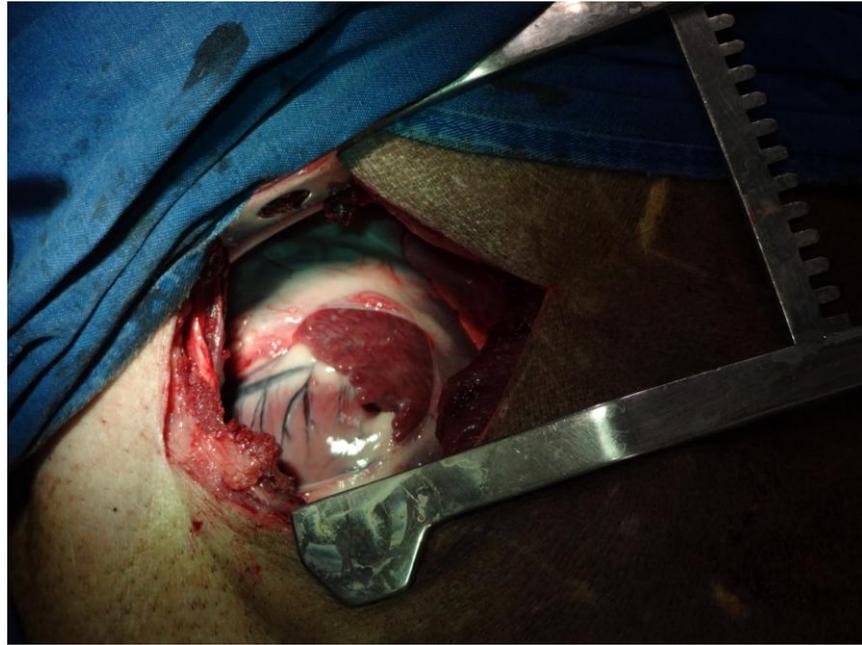


11

12 **Figura 7 –Mini porco em decúbito lateral direito. Incisão de pele com auxílio de bisturi elétrico, no 5º espaço**
13 **intercostal esquerdo, para acesso ao coração. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital**
14 **Veterinário/UENF, 2012.**

15

16



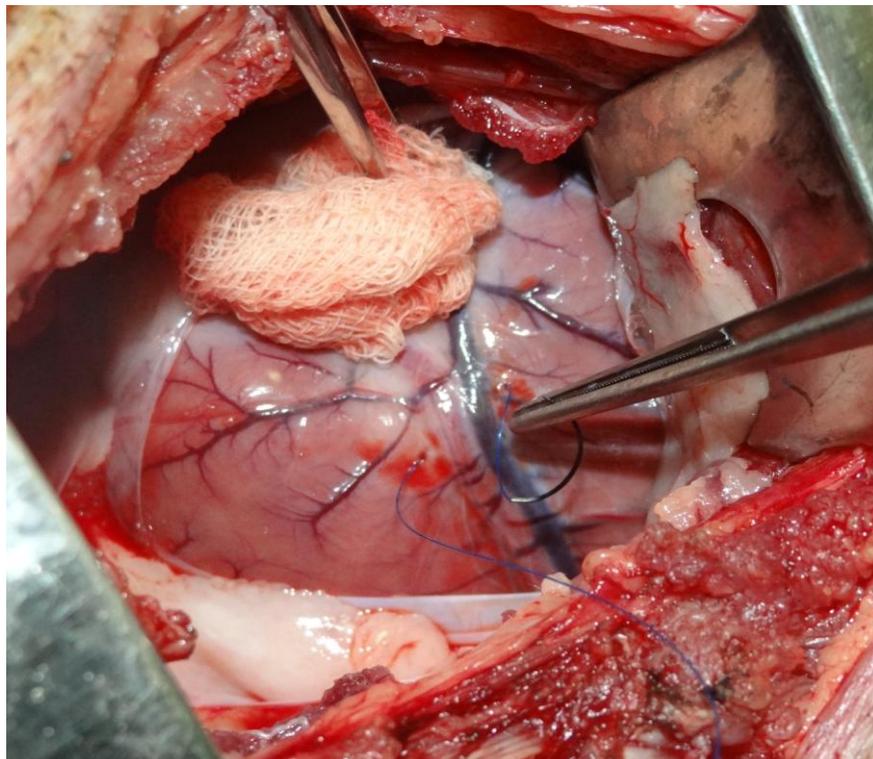
1

2

3

Figura 8 – Tórax de mini porco. Exposição do coração com auxílio de um afastador de Finocheto, após toracotomia esquerda. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.

4



5

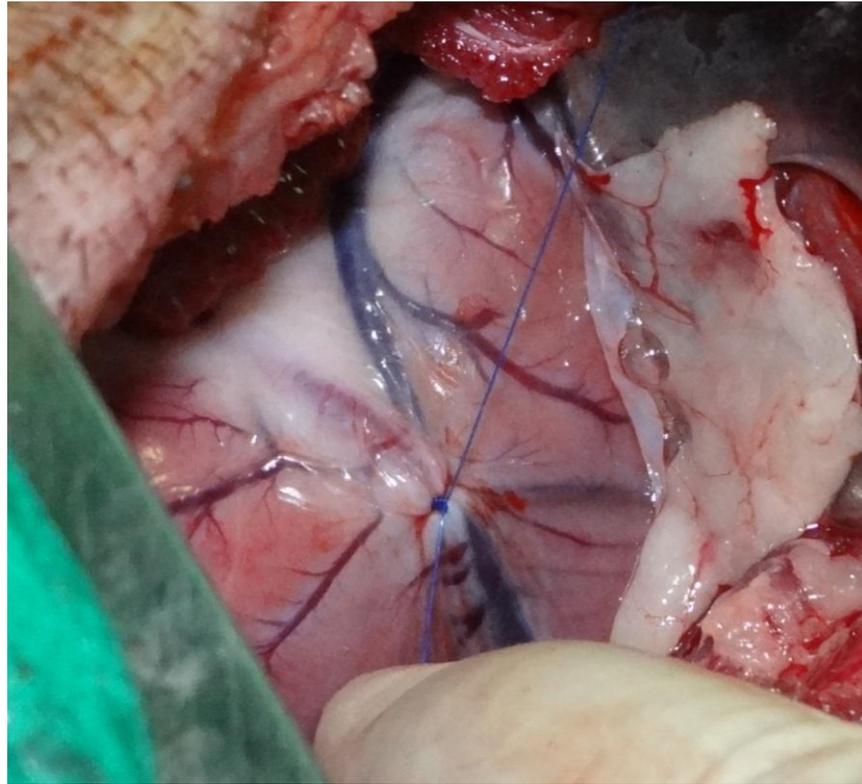
6

7

8

Figura 9 – Coração de mini porco. Início do procedimento de ligadura do ramo diagonal da coronária paraconal com fio prolene 6-0. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.

9



1

2

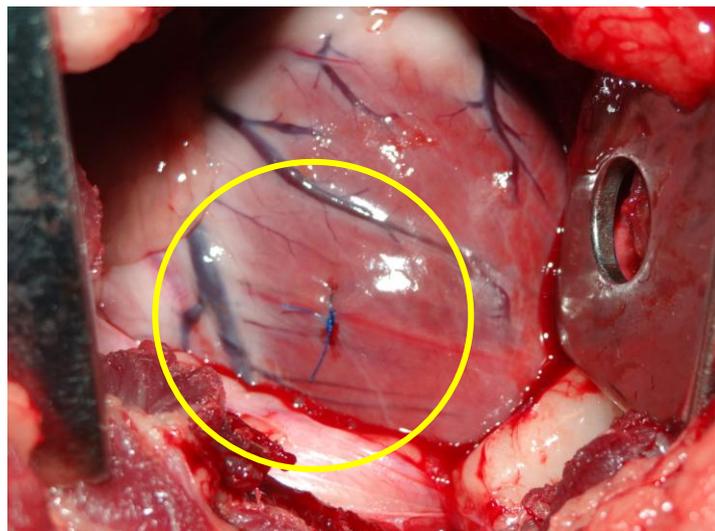
Figura 10 - Coração de mini porco. Final do procedimento de ligadura do ramo diagonal da coronária paraconal com fio prolene 6-0. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.

3

4

5

6



7

8

Figura 11 - Coração de mini porco. Ligadura do ramo diagonal da coronária paraconal com fio prolene 6-0 (destacada pelo círculo amarelo). Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.

9

10

11

1 Após o procedimento, os animais foram mantidos em ambiente apropriado
2 para recuperação, por 4 semanas. No pós operatório receberam antibioticoterapia
3 de amplo espectro durante 7 dias e antiinflamatório não estereoidal durante 5 dias,
4 ambas medicações por via intramuscular. A ferida cirúrgica (Figura 12) foi
5 higienizada, com solução salina estéril e aplicado spray de sulfadiazina de prata
6 duas vezes ao dia até total cicatrização.

7



8

9 **Figura 12 – Mini porco. Animal em decúbito lateral direito, local da sutura após toracotomia esquerda no 5º**
10 **espaço intercostal esquerdo (círculo). Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital**
11 **Veterinário/UENF, 2012.**

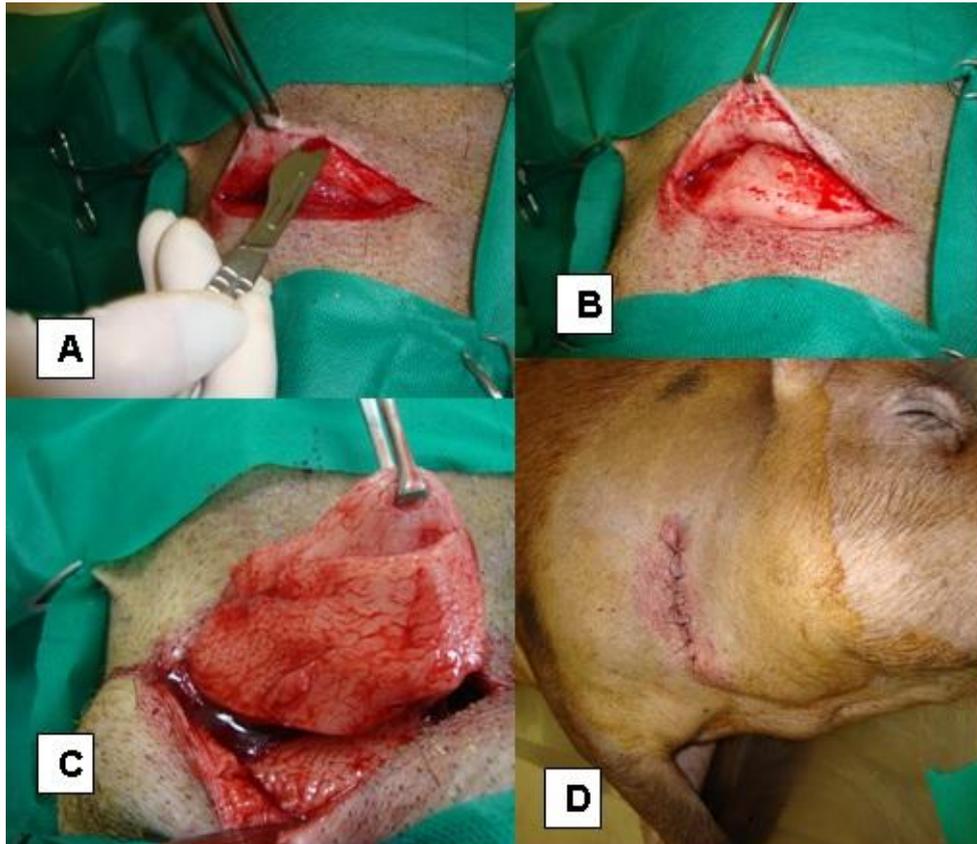
12

13 **3.5 PROTOCOLO DE POCESSAMENTE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS** 14 **ADIPOSO DERIVADAS**

15

16 As células tronco mesenquimais adiposo derivadas foram obtidas de tecido
17 adiposo submentoniano, mediante coleta através de procedimento cirúrgico sob
18 anestesia (Figura 13).

19



1
2 **Figura 13 – Mini porco. Sequência do procedimento de coleta do tecido adiposo. (A) Divulsão da pele; (B)**
3 **Elevação da pele, exposição do tecido adiposo; (C) Remoção do tecido adiposo; (D) Sutura na região da**
4 **coleta. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.**

5
6 Após a coleta os fragmentos de tecido adiposo foram acondicionados em
7 tubos Falcon (50 mililitros) com meio DMEM (Meio de Eale e Dulbecco modificado),
8 além de penicilina e estreptomicina (Figuras 14 e 15). As amostras foram enviadas
9 ao laboratório de Cardiologia Molecular e Celular, do Setor de Medicina
10 Experimental do Instituto de Cardiologia de Porto Alegre, RS, onde as células foram
11 isoladas e cultivadas em meio DMEM, suplementado com 15% de soro fetal bovino
12 em 5% de injeção de CO₂ a 37° C até a 4ª passagem, de acordo com o protocolo de
13 collagenase, seguindo metodologia previamente estabelecida (MEIRELLES, NARDI,
14 2003).

15

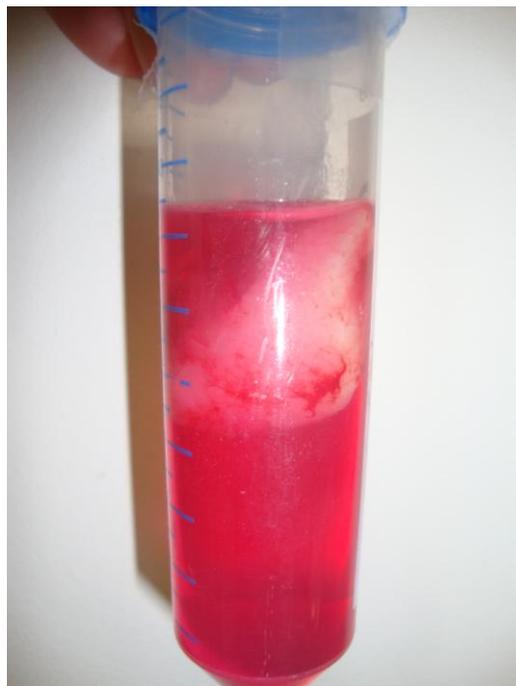
16



1

2 **Figura 14 - Fragmentos de tecido adiposo submentoniano de mini porco, após procedimento de coleta. Setor**
3 **de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.**

4



5

6 **Figura 15 – Fragmento de tecido adiposo de mini porco acondicionado em tudo Falcon contendo meio**
7 **DMEM. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.**

8

9

10 Quando alcançaram a “quarta passagem” (a passagem é necessária para
11 que se obtenha uma cultura "limpa", ou seja, sem contaminações com outros tipos

1 celulares, como hematopoiéticas, granulócitos, etc, é quando as células atingem
2 confluência – preenchimento da área de cultivo), o material retornou a Universidade
3 Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), e no Laboratório da Unidade
4 de Experimentação Animal do Hospital Veterinário/UENF, foram realizadas duas
5 lavagens com solução salina estéril, sendo que na última lavagem foi adicionado
6 0,02% de soro extraído de 10 mililitros de sangue de 01 indivíduo (mini porcos) do
7 grupo tratado. O objetivo da adição do soro foi fazer com que as células tronco
8 mesenquimais adiposo derivadas se adaptassem as proteínas contidas no sangue
9 dos mini porcos previamente.

10 Ao termino deste processo conseguimos atingir um número de células tronco
11 mesenquimais adiposo derivadas entre 5×10^6 e 1×10^7 células por mililitro de solução
12 salina, que foram injetadas no local da lesão isquêmica do miocárdio dos indivíduos
13 do grupo tratado. Como a coleta da gordura foi realizada em apenas 01 animal, e as
14 células, injetadas em todos os animais, classifica-se a terapia celular como
15 heteróloga (01 indivíduo doou para todos os indivíduos do grupo).

16

17 **3.6 PROTOCOLO DE TERAPIA CELULAR**

18

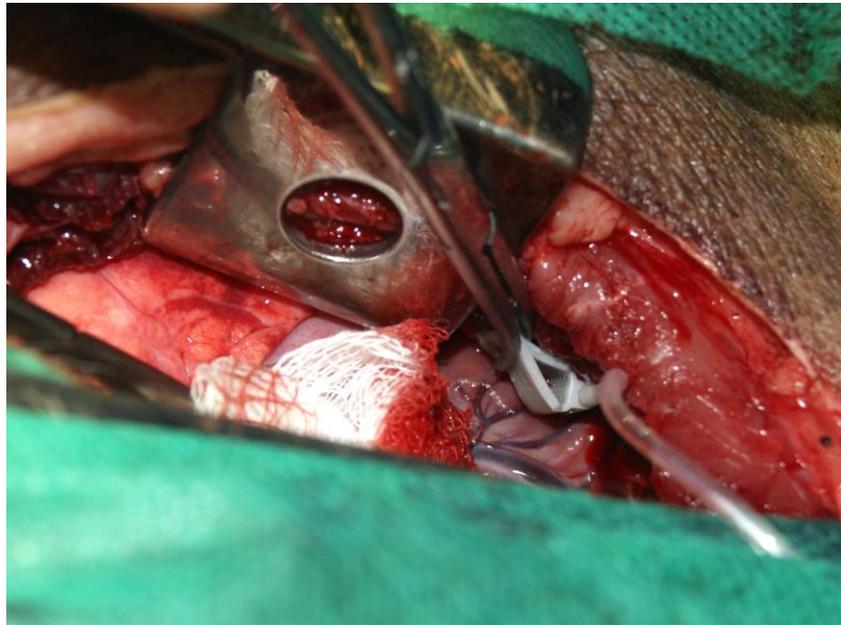
19 Logo após a indução do infarto, realizou-se a injeção de 1ml de solução salina
20 pura ou contendo células tronco mesenquimais adiposo derivadas, de acordo com o
21 grupo de tratamento, em 10 pontos (aproximadamente 0,2ml em cada ponto) ao
22 redor da área de miocárdio infartado. Foi utilizada agulha Butterfly 25F acoplada a
23 seringa de 3ml (Figura 16). Os animais foram divididos em 2 grupos, a saber:

- 24 • Grupo 1) Controle, que recebeu solução salina com 0,02% de soro
25 suíno;
- 26 • Grupo 2) Tratado, que recebeu solução contendo células tronco
27 mesenquimais adiposo derivadas, sendo 5×10^6 céls/ml.

28 Cada grupo experimental foi composto por 8 animais. Devido a fatores
29 externos ao experimento, 01 animal do grupo tratado veio a óbito, passando este

1 grupo a ser composto por 7 animais. Sendo então, o grupo controle composto por 8
2 animais e o grupo tratado por 7 animais.

3



4

5 **Figura 16 – Coração de mini porco. Momento da aplicação da terapia celular, ao redor do local onde foi**
6 **realizada a oclusão da coronária, com auxílio de agulha Butterfly 25F acoplada a seringa de 3 ml. Setor de**
7 **Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário/UENF, 2012.**

8

9 **3.7 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA**

10

11 Os animais foram avaliados por ecocardiografia transtorácica em três
12 momentos diferentes, imediatamente antes e após a indução da isquemia
13 miocárdica, e repetido 4 semanas após o procedimento cirúrgico, imediatamente
14 antes do procedimento de eutanásia. O exame ecocardiográfico foi realizado com os
15 animais anestesiados e posicionados em decúbito lateral esquerdo, em uma mesa
16 apropriada para o posicionamento do transdutor no hemitórax esquerdo do animal
17 (Figura 17). As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê
18 de Padronização do Modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia e as
19 imagens foram feitas a uma frequência de 13,0 MHz, para otimização da resolução e
20 a penetração do animal. Para registro das imagens utilizou-se gel de transmissão
21 para ultrassom de viscosidade média/alta. A partir da visualização do ventrículo

1 esquerdo (corte transversal) ao nível dos músculos papilares foi realizado o modo M
2 e obtidas as medidas das seguintes variáveis: diâmetro diastólico e sistólico do
3 ventrículo esquerdo e área acinética. A variável fração de ejeção do ventrículo
4 esquerdo foi obtida a partir do método de Simpson modificado, uma vez que é um
5 método mais fidedigno para corações infartados do que aqueles obtidos apenas a
6 partir do modo-M.

7



8

9 **Figura 17 – Exame ecocardiográfico em mini porco. Realização do exame de ecocardiografia, animal sob**
10 **efeito de anestesia endovenosa, em decúbito lateral direito. Setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais**
11 **do Hospital Veterinário/UENF, 2012.**

12

13 **3.8 EUTANÁSIA**

14

15 Os animais foram submetidos a anestesia geral profunda com administração
16 de tiopental sódico intravenoso, seguido de “sangria branca” da veia jugular e artéria
17 carótida, respeitando os princípios éticos da experimentação animal.

18 A eutanásia foi realizada 4 semanas após a indução do infarto.

19

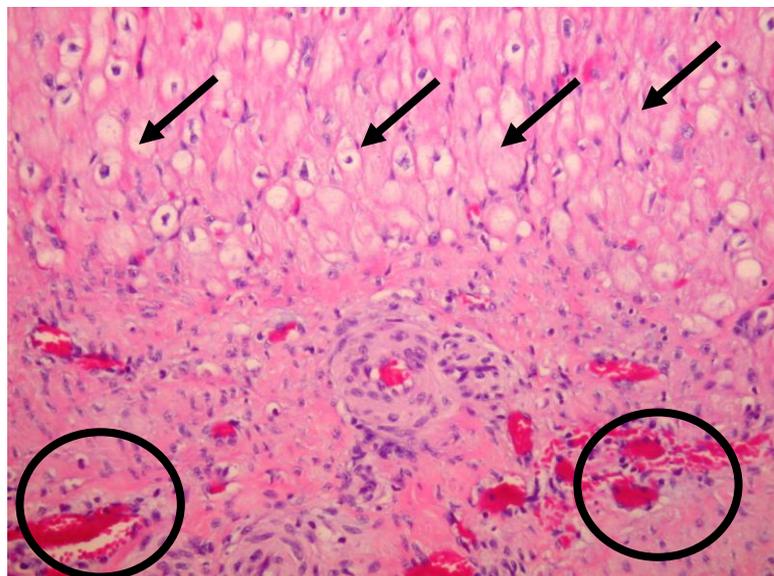
20

1 3.9 AVALIAÇÕES MORFOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA

2

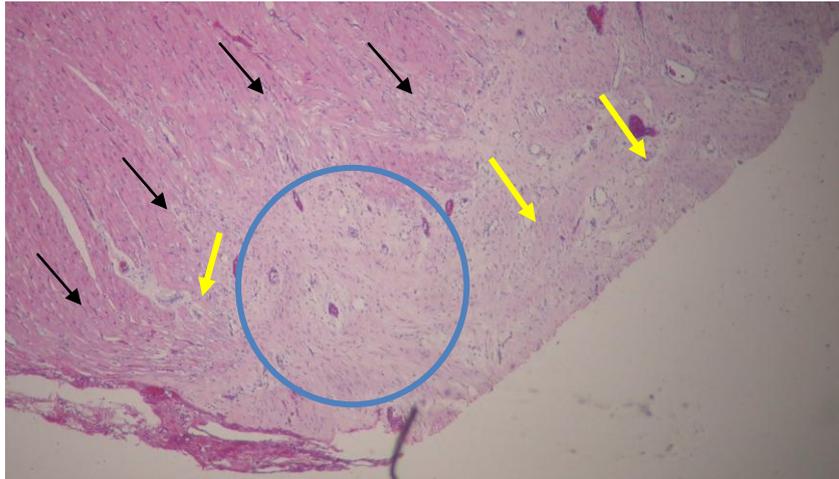
3 Após a eutanásia, o coração foi coletado, lavado e fixado em solução de
4 formol tamponado neutro a 10%. Após fixado, realizou-se a coleta de 4 amostras,
5 sendo elas, fragmento de ventrículo esquerdo lesado e não lesado, ventrículo direito
6 lesado e não lesado. Estas então foram encaminhadas ao Setor de Morfologia do
7 Laboratório de Morfologia e Patologia Animal/UENF, dispostas em histossetes
8 plásticos para posterior processamento. O processamento consistiu-se em
9 desidratação, diafinização e parafinização do tecido analisado. O material foi incluído
10 em blocos de parafina e foram realizados cortes histológicos em micrótomo semi
11 automático (5m). As amostras foram coradas em hematoxilina-eosina (Figuras 18 e
12 19) para posterior avaliação das alterações: degeneração hidrópica difusa, processo
13 inflamatório difuso, necrose tecidual e aderência pericárdio. Na avaliação
14 macroscópica foi observada presença de aderência do pericárdio (Figura 20).

15



16

17 **Figura 18 – Corte histológico do coração de mini porco. Miocardiócitos com degeneração hidrópica porém**
18 **viáveis (seta). Na parte inferior da figura presença de congestão (círculo), parte do processo cicatricial.**
19 **Coloração hematoxilina-eosina em aumento de 40X. Setor de Morfologia do Laboratório de Morfologia e**
20 **Patologia Animal/UENF, 2012.**



1

2

3

4

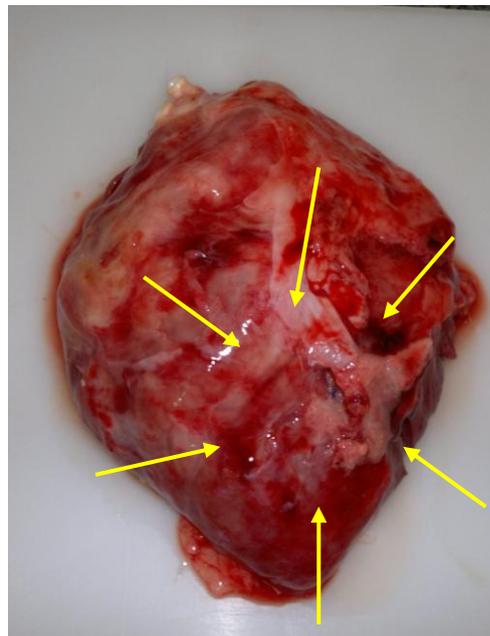
5

6

7

8

Figura 19 - Corte histológico do coração de mini porco. Degeneração hidrópica difusa leve (seta), moderada na região pericárdica e endocárdio (seta azul). Processo inflamatório mononuclear difuso moderado. Infiltrado gorduroso difuso leve. Congestão vascular difusa leve. Foco de necrose na região de endocárdio (círculo). Coloração hematoxilina-eosina em aumento de 40X. Setor de Morfologia do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal/UENF, 2012.



9

10

11

12

13

14

15

Figura 20 – Coração de mini porco. Coração no momento da coleta após procedimento de eutanásia. Presença de aderência do pericárdio (seta amarela). Setor de Morfologia do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal/UENF, 2012.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

1

2

3 Foi realizado um estudo das fontes de variação (grupo/tratamento) aplicando
4 análise de variância (ANOVA), utilizando o programa *The Statistical Analysis System*
5 (SAS). Em seguida foi realizado o teste de médias, Duncan com confiabilidade de
6 5%, nas variáveis do estudo, utilizando o programa *Genes*.

7 Para analisar tempo cirúrgico e alterações histopatológicas, foi utilizada a
8 estatística descritiva.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

5 COMITÊ DE ÉTICA

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul/Fundação Universitária de Cardiologia (Anexo 1). Os experimentos observam as práticas adequadas de manipulação de animais, de acordo com a literatura especializada.

6 RESULTADOS

O protocolo anestésico proposto mostrou-se satisfatório, permitindo a realização de todos os procedimentos com segurança, desde a cateterização da veia auricular até a realização do procedimento de indução da miocardiopatia isquêmica.

O acesso a cavidade torácica utilizando a técnica de toracotomia na altura do 5º espaço intercostal esquerdo mostrou-se adequada e suficiente para a visualização do coração, permitindo fácil acesso ao local onde foi realizada a ligadura do ramo diagonal da coronária paraconal para a indução da miocardiopatia isquêmica.

Neste experimento, 2 animais do grupo controle apresentaram alterações cardiorespiratórias durante o procedimento cirúrgico. Sendo que 01 animal apresentou fibrilação atrial esquerda, durante a indução da miocardiopatia isquêmica, e o outro apresentou parada cardiorespiratória, ao final do procedimento antes do fechamento do tórax, após a realização de manobras de ressuscitação cardiopulmonar, o animal sobreviveu.

Todos os animais retornaram de maneira satisfatória do procedimento anestésico. Após doze horas da realização do procedimento cirúrgico, todos os animais estavam completamente recuperados da anestesia, apresentando normorexia e normodipsia.

Ao longo dos trinta dias de pós cirúrgico os animais foram avaliados diariamente, sendo observado que nenhum animal apresentou sinais clínicos a curto ou a longo prazo, que caracteriza-se efeito deletério da miocardiopatia isquêmica, como por exemplo apatia, anorexia, alterações respiratórias. Não foram observadas complicações ou alterações comportamentais relacionadas a ferida cirúrgica (dor, deiscência de sutura, etc...).

Serão apresentados a seguir os resultados em relação ao tempo cirúrgico, avaliação ecocardiográfica e avaliação histopatológica.

1 6.1 TEMPO CIRÚRGICO

2

3 Foi considerado como tempo cirúrgico o período entre a incisão de pele para
 4 realização da toracotomia e o último ponto de sutura do fechamento do tórax. No
 5 grupo controle o tempo variou entre 17 e 35 minutos (média de 23,5 minutos). No
 6 grupo tratado com células tronco mesenquimais adiposo derivadas o tempo cirúrgico
 7 variou de 17 a 40 minutos (média de 28,28 minutos). Os tempos cirúrgicos de cada
 8 animal dentro de seu respectivo grupo serão apresentados nas tabelas a seguir
 9 (Tabelas 1 e 2).

10

11 **Tabela 1:** Tabela com o tempo cirúrgico de cada individuo do grupo controle e a média dos tempos.

Grupo Controle									
Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	Média
Tempo cirúrgico(min)	30	25	21	18	23	19	35	17	23.5

12

13 **Tabela 2:** Tabela com o tempo cirúrgico de cada individuo do grupo tratado com células tronco
 14 mesenquimais adiposo derivadas e a média dos tempos.

Grupo Tratado								
Animal	1	2	3	4	5	6	7	Média
Tempo cirúrgico(min)	40	21	30	35	25	30	17	28,28

15

16

17 6.2 AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRAFICA

18

19 Através da realização do exame de ecocardiografia transtorácica, em 3
 20 momentos diferentes, sendo, imediatamente antes e após a indução da isquemia
 21 miocárdica e repetido 4 semanas após o procedimento cirúrgico, foram avaliadas as
 22 seguintes variáveis: fração de ejeção do ventrículo esquerdo, diâmetro diastólico do
 23 ventrículo esquerdo, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo e área acinética

1 (somente na avaliação realizada no pós operatório imediato e 4 semanas após
2 procedimento cirúrgico).

3

4 **6.2.1 ANÁLISE DE VARIÂNCIA**

5

6 O teste de análise de variância foi empregado para comparar os dois grupos
7 (controle/ tratado) com os tratamentos (períodos pré operatório, pós operatório
8 imediato e pós 30 dias) e as três variáveis (fração de ejeção, diâmetro diastólico e
9 sistólico do ventrículo esquerdo) (Tabela 3). Posteriormente foi avaliado novamente
10 acrescentando uma quarta variável (área acinética) (Tabela 4).

11

12 **Tabela 3:** resumo do teste de análise de variância (ANOVA), comparando os dois grupos (controle/
13 tratado) com os tratamento (períodos pré operatório, pós operatório imediato e pós 30 dias) e as três
14 variáveis (fração de ejeção, diâmetro diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo).

FV	GL	Quadrado médio		
		X ₁	X ₂	X ₃
Bloco	7			
Grupo	1	233,49 ^{ns}	7,33**	6,23**
Tratamento	2	280,96 ^{ns}	1,51*	2,49**
GrupoxTratamento	2	85,18 ^{ns}	1,03*	0,002 ^{ns}
Resíduo	32	6862,7	0,322	0,24
Total	44			
CV%		23,22	19,65	11,99
Média		63,06	2,88	4,1

15

16 **Legenda:** ns: não significativo; (*) significativo a 5%; (**) significativo a 1%. X₁ representa a variável
17 fração de ejeção; X₂ variável diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo e X₃ variável diâmetro
18 diastólico do ventrículo esquerdo. CV% coeficiente de variação.

19

20 Dentro da variável fração de ejeção (X₁) os fatores grupo e tratamento e sua
21 interação apresentam efeito não significativo, ou seja, as médias são
22 estatisticamente iguais, não há efeito significativo de tratamento. Na variável

1 diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (X_2) os fatores grupo e tratamento e sua
2 interação apresentam efeito significativo, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste
3 F, ou seja, as médias não são estatisticamente iguais, há efeito significativo de
4 tratamento. Analisando a variável diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (X_3) os
5 fatores grupo e tratamento apresentam efeito significativo, ao nível de 1% de
6 probabilidade pelo teste F, ou seja, as médias não são estatisticamente iguais, há
7 efeito significativo de tratamento. A interação grupo x tratamento na variável
8 diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (X_3) apresentou efeito não significativo,
9 ou seja, as médias são estatisticamente iguais, não há efeito significativo de
10 tratamento.

11 O coeficiente de variação fornece a variação dos dados obtidos em relação à
12 média. Quanto menor for o seu valor, mais homogêneos serão os dados e mais
13 preciso será o experimento, ou seja, não teve variação ambiental. O coeficiente de
14 variação é considerado baixo (considerado bom, apontando um conjunto de dados
15 bem homogêneos) quando for menor ou igual a 25%, acima deste valor é
16 considerado alto e caracteriza que o experimento sofreu influência do ambiente.

17 Analisando o coeficiente de variação na tabela 3, observamos que a variável
18 fração de ejeção (X_1) apresentou um maior coeficiente (CV% 23,22) quando
19 comparado a variável diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (X_3) (CV% 11,99),
20 ou seja, a variável diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (X_3) foi mais
21 homogênea que a variável fração de ejeção (X_1). Já a variável diâmetro sistólico do
22 ventrículo esquerdo (X_2) (CV% 19,65) apresentou um valor intermediário entre fração
23 de ejeção (X_1) e variável diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (X_3),
24 considerado um valor bom.

25

26

27

28

29

30

1 **Tabela 4:** resumo do teste de análise de variância (ANOVA), comparando os dois grupos (controle/
 2 tratado) com os tratamento (períodos: pré operatório, pós operatório imediato e pós 30 dias) e a
 3 quarta variância (área acinética).

FV	Quadrado médio	
	GL	X_4
Bloco	7	
Grupo	1	583,4**
Tratamento	1	9,91 ^{ns}
GrupoxTratamento	1	100,98 ^{ns}
Resíduo	19	25,83
Total	29	
CV%		16,67
Média		30,48

4

5 **Legenda:** ns: não significativo; (**) significativo a 1%. X_4 representa a variável área acinética.

6

7 Dentro da variável área acinética (X_4) o fator grupo apresentou efeito
 8 significativo, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, ou seja, as médias não
 9 são estatisticamente iguais, há efeito significativo de tratamento. O fator tratamento
 10 e a interação grupo x tratamento apresentaram efeito não significativo, ou seja, as
 11 médias são estatisticamente iguais, não há efeito significativo de tratamento

12 Na tabela 4 observa-se que a variável área acinética (X_4) apresentou um CV%
 13 baixo (CV% 16,67), coeficiente considerado bom, apontando um conjunto de dados
 14 bem homogêneos.

15

16

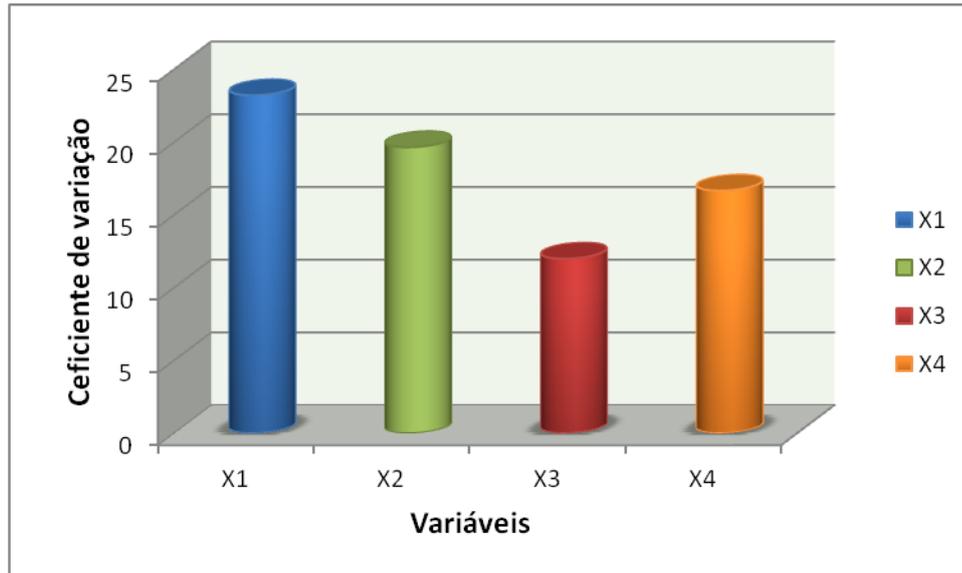
17

18

19

20

21



1

2 **Figura 21** – Gráfico da relação entre dos coeficientes de variação das quatro variáveis. Sendo X1
 3 fração de ejeção; X2 diâmetro do sistólico ventrículo esquerdo; X3 diâmetro diastólico do ventrículo
 4 esquerdo e X4 área acinética.

5

6 **6.2.2 TESTE DE DUNCAM**

7

8 Para analisar as médias de cada variável (fração de ejeção, diâmetro sistólico
 9 do ventrículo esquerdo, diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo e área acinética),
 10 dentro de cada grupo (controle e tratado) e em cada tratamento (período pré
 11 operatório, pós operatório imediato e pós trinta dias) foi empregado o teste de
 12 comparação de médias Duncan.

13

14

15

16

17

18

19

1 6.2.2.1 VARIÁVEL FRAÇÃO DE EJEÇÃO

2

3 Analisando a tabela 5 na horizontal, ou seja, os dados referentes ao grupo 1,
4 pode-se observar que as médias nos três tratamentos (períodos de avaliação: pré
5 operatório, pós operatório imediato, pós trinta dias do procedimento cirúrgico não
6 diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade (representado pela
7 letra “a” minúscula). O mesmo ocorre para o grupo 2.

8

9 **Tabela 5:** Médias da fração de ejeção em dois grupos de animais (controle/tratamento) em diferentes
10 períodos de avaliação.

Grupo/Tratamento	Fração de ejeção		
	1	2	3
1	63,58 aA	58,48 aA	60,73 aA
2	78,27 aA	57,77 aA	69,32 aA

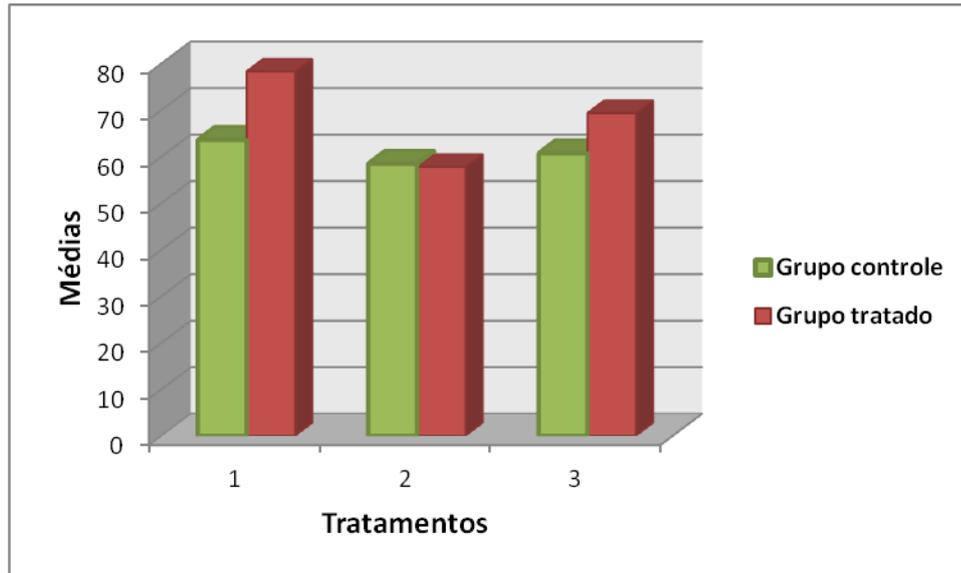
11

12 **Legenda:** Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem
13 entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Grupo 1: grupo controle; grupo 2: grupo
14 tratado. Tratamento 1: dados avaliados no período pré operatório; tratamento 2: dados avaliados no
15 período pós operatório imediato; tratamento 3: dados avaliados no período 30 dias após a indução da
16 miocardiopatia isquêmica.

17

18 Na análise da tabela 5 na vertical, ou seja, comparando as médias entre os
19 grupos dentro de cada tratamento (representado por letras maiúsculas), é observado
20 que as médias dos grupos não diferem entre si nos três tratamentos pelo teste de
21 Duncan a 5% de probabilidade.

22



1

2 **Figura 22** – Gráfico ilustrando a comparação entre as médias da variável fração de ejeção dos
 3 grupos controle e tratado, nos 3 tratamentos.

4

5 **6.2.2.2 VARIÁVEL DIÂMETRO SISTÓLICO DO VENTRÍCULO ESQUERDO**

6

7 Analisando a tabela 6 na horizontal, ou seja, as dados referentes ao grupo 1,
 8 pode-se observar que as médias nos três tratamentos (períodos de avaliação: pré
 9 operatório, pós operatório imediato, pós trinta dias do procedimento cirúrgico) não
 10 diferem entre si pelo teste de Duncam a 5% de probabilidade (representados pela
 11 letra “a” minúscula). Já no grupo 2, as médias dos tratamentos 1 e 2 diferem entre si
 12 pelo teste de Duncam a 5% de probabilidade (representados respectivamente pelas
 13 letras “b” e “a” minúsculas), porém as médias dos tratamentos 1 e 3 não diferem
 14 entre si pelo teste de Duncam a 5% de probabilidade (representados
 15 respectivamente pelas letras “b” e “ab” minúsculas). O mesmo ocorre quando
 16 comparamos as médias dos tratamentos 2 e 3 (representados respectivamente
 17 pelas letras “a” e “ab” minúscula).

18

19

20

1 **Tabela 6:** Médias dos diâmetros sistólicos do ventrículo esquerdo em dois grupos de animais
 2 (controle/tratamento) em diferentes períodos de avaliação.

		Diâmetro sistólico		
Grupo/Tratamento		1	2	3
1		2,32 aA	2,5 aA	2,71 aA
2		2,78 bB	3,91 aB	3,24 abB

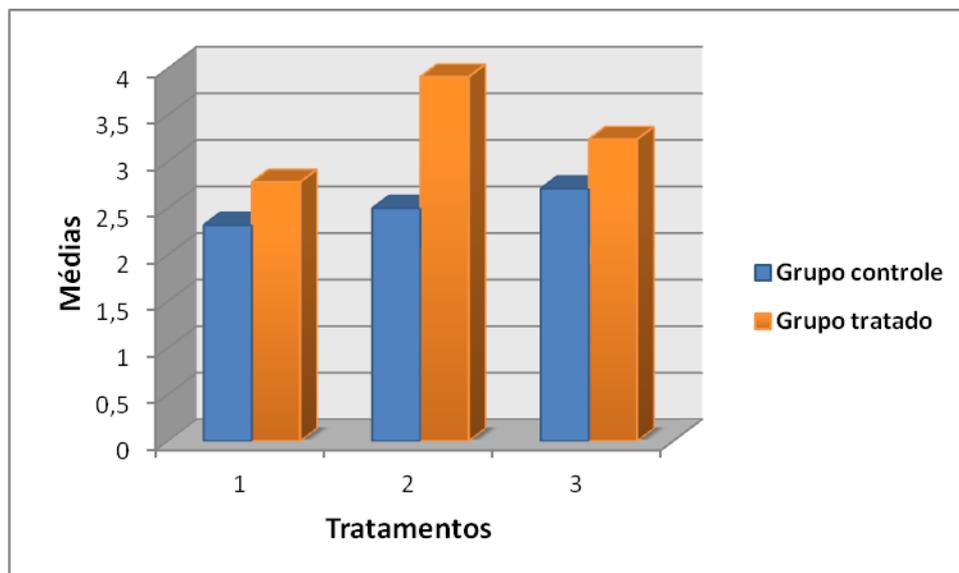
3

4 **Legenda:** Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem
 5 entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Grupo 1: grupo controle; grupo 2: grupo tratado.
 6 Tratamento 1: dados avaliados no período pré operatório; tratamento 2: dados avaliados no período
 7 pós operatório imediato; tratamento 3: dados avaliados no período 30 dias após a indução da
 8 miocardiopatia isquêmica.

9

10 Quando a tabela 6 é analisada na vertical, ou seja, comparando as médias
 11 entre os grupos dentro de cada tratamento (representado por letras maiúsculas “A” e
 12 “B”), é observado que as médias dos grupos diferem entre si nos três tratamentos
 13 pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

14



15

16 **Figura 23** - Gráfico ilustrando a comparação entre as médias da variável diâmetro sistólico do
 17 ventrículo esquerdo dos grupos controle e tratado, nos 3 tratamentos.

18

6.2.2.3 VARIÁVEL DIÂMETRO DIASTÓLICO DO VENTRÍCULO ESQUERDO

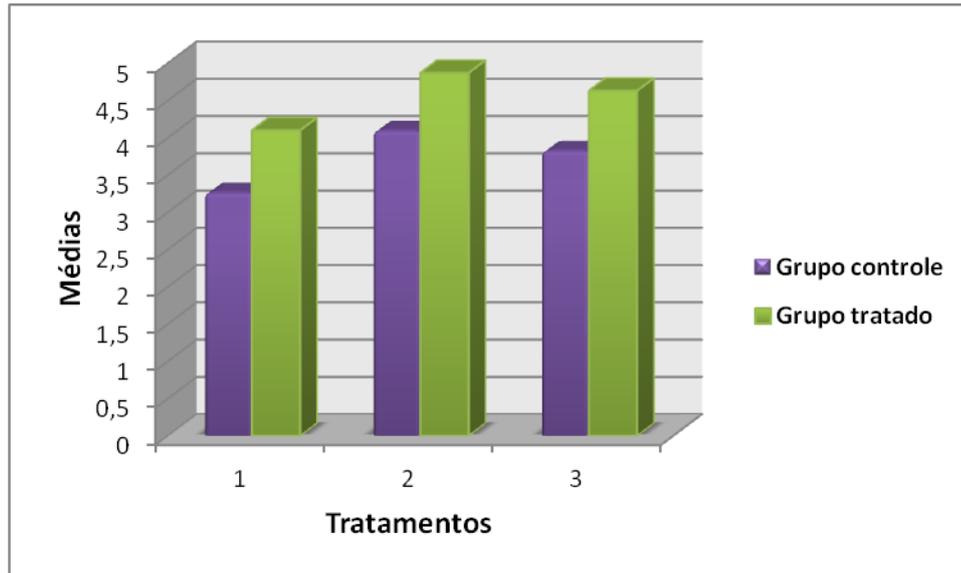
Analisando a tabela 7 na horizontal, ou seja, os dados referentes ao grupo 1, observa-se que as médias dos tratamentos 1 e 2 (representados pelas letras “b” e “a” minúsculas, respectivamente) diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, o mesmo ocorre na comparação dos tratamentos 1 e 3, porém na comparação dos tratamentos 2 e 3 (representados pela letra “a” minúscula) observa-se que as médias não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. O mesmo ocorre no grupo 2.

Tabela 7: Médias dos diâmetros diastólicos do ventrículo esquerdo em dois grupos de animais (controle/tratamento) em diferentes períodos de avaliação.

Grupo/Tratamento	Diâmetro diastólico		
	1	2	3
1	3,26 bA	4,09 aA	3,82 aA
2	4,1 bB	4,87 aB	4,63 aB

Legenda: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Grupo 1: grupo controle; grupo 2: grupo tratado. Tratamento 1: dados avaliados no período pré operatório; tratamento 2: dados avaliados no período pós operatório imediato; tratamento 3: dados avaliados no período 30 dias após a indução da miocardiopatia isquêmica.

Na análise da tabela 7 na vertical, ou seja, comparando as médias entre os grupos dentro de cada tratamento (representado por letras maiúsculas “A” e “B”), é observado que as médias dos grupos diferem entre si nos três tratamentos pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.



1

2 **Figura 24** - Gráfico ilustrando a comparação entre as médias da variável diâmetro diastólico do
3 ventrículo esquerdo dos grupos controle e tratado, nos 3 tratamentos.

4

5 **6.2.2.4 VARIÁVEL ÁREA ACINÉTICA**

6

7 Analisando a tabela 8 na horizontal, ou seja, as dados referentes ao grupo 1,
8 observa-se que as médias nos dois tratamentos (pós operatório imediato, pós trinta
9 dias do procedimento cirúrgico) não diferem entre si pelo teste de Duncam a 5% de
10 probabilidade (representado pela letra “a” minúscula). O mesmo ocorre para o grupo
11 2.

12 **Tabela 8:** Médias das áreas acinéticas em dois grupos de animais (controle/tratamento) em diferentes
13 períodos de avaliação.

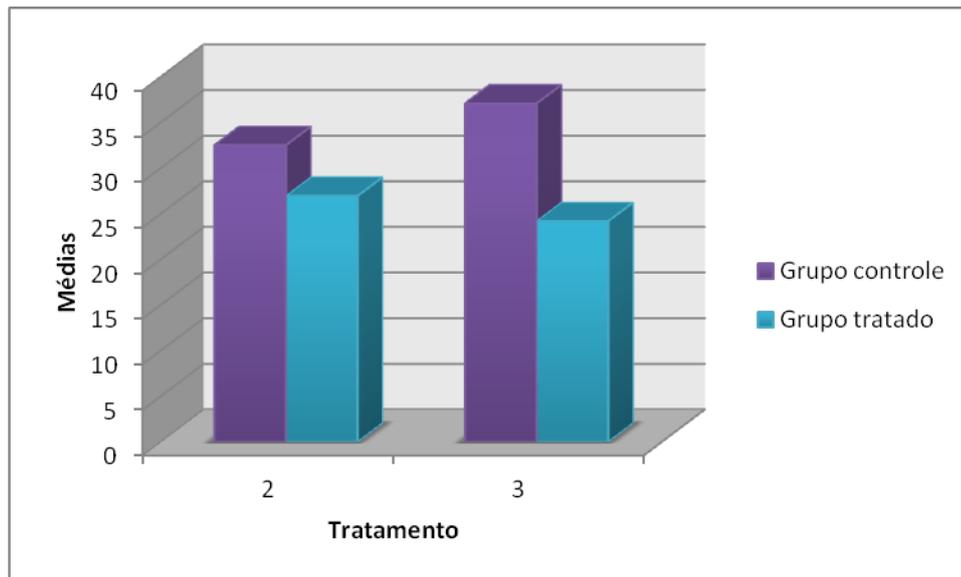
Grupo/Tratamento	Área acinética	
	2	3
1	32,5 aA	37,08 aA
2	26,94 aB	24,17 aB

14

15 **Legenda:** Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem
16 entre si pelo teste de Duncam a 5% de probabilidade. Grupo 1: grupo controle; grupo 2: grupo
17 tratado. Tratamento 2: dados avaliados no período pós operatório imediato; tratamento 3: dados
18 avaliados no período 30 dias após a indução da miocardiopatia isquêmica.

1 Quando a tabela 8 é analisada na vertical, ou seja, comparando as médias
2 entre os grupos dentro de cada tratamento (representado por letras maiúsculas “A” e
3 “B”), observa-se que as médias dos grupos diferem entre si nos dois tratamentos
4 pelo teste de Duncam a 5% de probabilidade.

5



6

7 **Figura 25** – Gráfico ilustrando a comparação entre as médias da variável área acinética dos grupos
8 controle e tratado, nos 3 tratamentos.

9

10 **6.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA**

11

12 Após a preparação dos cortes histológicos, foram realizadas avaliações
13 através de microscopia óptica, considerando as seguintes alterações, degeneração
14 hidrópica difusa e processo inflamatório difuso, que foram classificadas de acordo
15 com o grau de severidade em escore 1, 2, 3, necrose tecidual focal ou difusa.

16

17

18

19

1 6.3.1 DEGENERAÇÃO HIDRÓPICA DIFUSA

2

3 Foram avaliados os quatro cortes histológicos, classificando a presença de
4 degeneração hidrópica difusa. Os dados serão apresentados na tabela seguinte
5 (Tabela 9), em forma de porcentagem de acordo com cada corte histológico. Sendo
6 as alterações classificadas em leve, moderada e severa.

7

8 **Tabela 9:** Porcentagem da presença de degeneração hidrópica difusa em cada corte histológico de
9 acordo com cada grau de severidade, sendo leve, moderado e severo.

Degeneração hidrópica difusa												
Grupo/corte	Escore 1				Escore 2				Escore 3			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	37,50%	50%	75%	62,50%	62,50%	12,50%	12,50%	37,50%	0,00%	12,50%	0,00%	0,00%
2	71,40%	85,70%	71,50%	42,80%	14,20%	14,20%	14,20%	42,80%	0,00%	0,00%	0,00%	14,20%

10

11 **Legenda:** Grupo 1 dados referentes ao grupo controle; grupo 2 dados referentes aos grupo tratado.
12 Letra "A" referente ao corte histológico da região ventrículo direito lesado; letra "B" ventrículo direito
13 não lesado; letra "C" ventrículo esquerdo não lesado e letra "C" ventrículo esquerdo lesado.

14

15 Analisando os dados do corte A (ventrículo direito lesado), pode-se observar
16 que no grupo 1 tivemos 62,50% das alterações de degeneração hidrópica em grau
17 moderado, enquanto no grupo 2, houve prevalência de degeneração hidrópica difusa
18 com grau leve, sendo representada por 71,40%.

19 Já nos cortes B, C, os dois grupos apresentaram prevalência de degeneração
20 hidrópica difusa de grau leve. Por fim, no corte D, no grupo 1 foi observado que
21 62,50% das alterações apresentavam-se em grau leve, diferente do grupo 2, onde
22 foram observadas alterações em grau leve e moderado, representadas por uma
23 mesma porcentagem (42,80%).

24 Ao analisar a presença de degeneração hidrópica sem levar em consideração
25 cada corte histológico, os resultados encontrados nos dois grupos foram
26 semelhantes. No grupo controle, oito indivíduos apresentaram degeneração

1 hidrópica de grau leve, cinco com grau moderado e apenas um com grau severo.
 2 No grupo tratado evidenciou-se que seis indivíduos apresentaram grau leve de
 3 degeneração, três com grau moderado e apenas um com degeneração em grau
 4 severo.

5

6 6.3.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO DIFUSO

7

8 Avaliou-se os quatro cortes histológicos, observando a presença de processo
 9 inflamatório difuso. Os dados serão apresentados na tabela seguinte (Tabela 10),
 10 em forma de porcentagem de acordo com cada corte histológico. Sendo as
 11 alterações classificadas em leve, moderado e severo.

12

13 **Tabela 10:** Porcentagem da presença de processo inflamatório difuso em cada corte histológico de
 14 acordo com cada grau de severidade, sendo leve, moderado e severo.

Processo inflamatório difuso												
Escore 1					Escore 2				Escore 3			
Grupo/corte	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	50%	62,50%	75%	75%	25%	12,50%	0,00%	12,50%	12,50%	0,00%	0,00%	0,00%
2	100%	71,40%	85,70%	42,80%	0,00%	28,50%	14,28%	28,50%	0,00%	0,00%	0,00%	28,50%

15

16 **Legenda:** Grupo 1 dados referentes ao grupo controle; grupo 2 dados referentes aos grupo tratado.
 17 Letra "A" referente ao corte histológico da região ventrículo direito lesado; letra "B" ventrículo direito
 18 não lesado; letra "C" ventrículo esquerdo não lesado e letra "C" ventrículo esquerdo lesado.

19

20 Na tabela acima, relativa a processo inflamatório difuso, constata-se que,
 21 tanto o grupo 1 quanto o grupo 2, apresentaram prevalência de processo
 22 inflamatório difuso de grau leve em todos os cortes histológico (A, B, C, D). Todos os
 23 indivíduos apresentaram processo inflamatório de grau leve.

24 No grupo controle dois animais apresentaram grau moderado e apenas um
 25 com grau severo. O grupo tratado apresentou um numero maior de indivíduos com

1 alteração em grau moderado, sendo 4, o número de indivíduos com esse grau de
2 severidade da alteração e 2 animais com grau severo.

3

4 **6.3.3 NECROSE TECIDUAL**

5

6 Avaliou-se os quatro cortes histológicos, observando a presença de necrose
7 tecidual. Os dados serão apresentados na tabela seguinte (Tabela 11), em forma de
8 porcentagem de acordo com cada corte histológico. Sendo as alterações
9 classificadas em focal ou difuso.

10

11 **Tabela 11:** Porcentagem da presença de necrose tecidual em cada corte histológico sendo
12 classificado em focal ou difuso.

Necrose tecidual								
Grupo/corte	Local				Difusa			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1	50%	0,00%	0,00%	75%	12,50%	0,00%	0,00%	0,00%
2	0,00%	0,00%	0,00%	14,20%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

13

14 **Legenda:** Grupo 1 dados referentes ao grupo controle; grupo 2 dados referentes aos grupo tratado.
15 Letra "A" referente ao corte histológico da região ventrículo direito lesado; letra "B" ventrículo direito
16 não lesado; letra "C" ventrículo esquerdo não lesado e letra "C" ventrículo esquerdo lesado.

17

18 De acordo com a tabela acima, no grupo 1 foi observado que 50% dos
19 indivíduos apresentaram necrose tecidual local no corte A e 75% no corte D. Sendo
20 que somente 12,50% apresentaram necrose tecidual difusa no corte A.

21 Já no grupo 2 foi observada apenas necrose tecidual local em 14,20% no
22 corte D.

23 Quando analisarmos a presença de necrose tecidual sem levar em
24 consideração cada corte, constatamos que todos os indivíduos do grupo controle
25 apresentaram área focal de necrose tecidual e apenas 01 individuo apresentou

1 necrose difusa. Enquanto no grupo tratado foi evidenciada necrose tecidual focal em
2 apenas 01 indivíduo.

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

7 DISCUSSÃO

1
2
3 A utilização do modelo experimental mini porco mostrou-se adequada, sendo
4 constatada facilidade de manejo, segurança e eficácia nos procedimentos
5 realizados. Esse modelo experimental foi capaz de reproduzir fidedignamente o
6 infarto agudo do miocárdio após a oclusão do ramo diagonal da coronária paraconal,
7 fato esse que se justifica pela sua semelhança com a bioquímica, morfologia e a
8 fisiologia cardiovascular com a espécie humana (MARIANO, 2003). Mariano (2003) e
9 Vulliet et al (2004) apontaram a importância do uso de modelos experimentais bem
10 definidos e que possam mimetizar situações pato-fisiológicas humanas. Sendo o
11 mini porco desenvolvido no Brasil (MARIANO, 2003) e criado especificamente para a
12 pesquisa. Esse modelo vem sendo utilizado em várias linhas de pesquisa como
13 cardíaca, renal, gástrica endócrina, além de lesões ósseas e cutâneas, com enorme
14 sucesso. Schuleri et al (2008) utilizaram esse mesmo modelo experimental em sua
15 pesquisa, alcançando resultados promissores em relação a terapia celular.

16 A ligadura do ramo diagonal da coronária paraconal foi capaz de produzir uma
17 eficaz isquemia do miocárdio, gerando uma área de acinesia, evidenciada em todos
18 os animais, tanto do grupo controle quanto do grupo tratado, através do exame de
19 ecocardiografia realizado no período pós operatório imediato. Essa mesma área não
20 havia sido encontrada no exame realizado no período pré operatório, o que
21 comprova que o infarto foi provocado com sucesso, esse mesmo sucesso da técnica
22 foi relatado pelo pesquisador Schuleri et al (2008) . Souza et al (2004) e Guarita-
23 Souza et al (2005) utilizaram a mesma técnica de ligadura da coronária com o intuito
24 de induzir o infarto, porém no modelo experimental rato Wistar, obtendo sucesso no
25 procedimento.

26 Guarita-Souza et al (2005) descrevem como objetivo principal do transplante
27 de células tronco mesenquimais a colonização da área isquêmica com novas
28 células, promovendo retorno da função contrátil, sendo este efeito avaliado através
29 do exame de ecocardiografia, onde são analisadas as variáveis fração de ejeção,
30 diâmetro sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo e a extensão da área acinética.
31 Um estudo realizado por Schuleri et al (2002), utilizando como modelo experimental

1 o suíno, evidenciou que oito semanas após a infusão intramiocárdica de células
2 tronco mesenquimais houve melhora significativa da função contrátil do coração.

3 Em nossa pesquisa a terapia celular foi administrada imediatamente após a
4 indução da miocardiopatia isquêmica, segundo Valina et al (2007), esse seria o
5 melhor momento, já que edema intersticial do miocárdio após a revascularização
6 persiste por pelo menos 7 dias, além de um aumento progressivo da obstrução da
7 microcirculação nas primeiras 48 horas, limitando a distribuição adequada das
8 células tronco, por isso a importância da aplicação precocemente. Além disso, Chen
9 et al (2001) demonstraram que um grande número de células injetadas
10 precocemente, após um evento isquêmico, resulta em melhores índices de fixação,
11 segundo resultados obtidos comparando a aplicação de células tronco
12 mesenquimais no primeiro dia e no décimo quarto dia após o infarto, sugerindo a
13 teoria de que essas células agem especificamente em resposta à isquemia.
14 Freyman et al (2006) relataram sucesso ao administrar células tronco mesenquimais
15 15 minutos após o infarto do miocárdio. Porém nos estudos realizados por Assmus
16 et al (2002), Chen et al (2004), Woolert et al (2004), Bocchi et al (2005) e Strauer et
17 al (2005) a administração da terapia de células tronco variou dentro de um intervalo
18 de 4 a 10 dias, demonstrando resultados positivos em termos de função cardíaca.
19 Por sua vez, Schachinger et al (2004) afirmam que o intervalo entre o terceiro e o
20 sétimo dia após o infarto seja o período mais propício para a administração da
21 terapia.

22 Segundo Bocchi et al (2005) a via de administração deve ser escolhida com o
23 intuito de fornecer, transplantar um número suficiente de células para a região
24 isquêmica, sendo as principais, intracoronariana e a intramiocárdica, sendo esta, a
25 via na qual realizou-se a administração da terapia celular com células tronco
26 mesenquimais adiposo derivadas em nossa pesquisa. Valina et al (2007), citam que
27 alguns estudos como BOOST e TOPCARE, demonstraram que a infusão
28 intravenosa não forneceu um número mensurável de células. Além disso, alguns
29 autores como Vulliet et al (2004), Bartunek et al (2005) e Souza et al (2010) relatam
30 que o diâmetro das células tronco mesenquimais é maior que o de outros tipos de
31 células tronco, podendo provocar embolia, oclusão da microcirculação, gerando
32 microinfartos, quando a via de aplicação de escolha for a intracoronariana;
33 entretanto essa via tem sido utilizada em vários estudos clínicos, sem apresentar

1 qualquer efeito adverso, como por exemplo, no estudo clínico realizado por Chen et
2 al (2004). De acordo com Angeli et al (2007), a via intracoronariana só deveria ser
3 utilizada, quando se têm certeza da integridade da árvore coronariana, permitindo
4 uma efetiva distribuição das células tronco.

5 Em relação a avaliação da fração de ejeção, não foi observada diferença
6 estatística entre os valores das médias nos períodos pré operatório, pós operatório
7 imediato e pós 30 dias do procedimento cirúrgico, no grupo tratado com células
8 tronco mesenquimais adiposo derivadas, o mesmo ocorreu no grupo controle.
9 Apesar de não ter sido encontrada diferença significativa no teste de médias,
10 ocorreu um aumento de 3,8% no valor da fração de ejeção no grupo controle, ou
11 seja, uma melhora de 3,8% entre os períodos pós operatório imediato e pós 30 dias.
12 Enquanto no grupo tratado o aumento foi de 20%, o que demonstra a eficácia da
13 terapia celular quando comparado ao grupo controle. A fração de ejeção é uma
14 análise utilizada com finalidade prognóstica da alteração da função cardíaca, ou
15 seja, quanto menor a fração de ejeção pior o prognóstico do paciente em relação a
16 alterações cardiovasculares. Ela equivale ao percentual de sangue que o ventrículo
17 esquerdo ejeta para a aorta na sístole. Isto é, se houve um aumento de 20% no
18 valor da fração de ejeção no grupo tratado do período pós operatório imediato para o
19 período pós 30 dias, significa que o ventrículo esquerdo ejetou 20% a mais de
20 sangue para a aorta comparando um período ao outro, chegando a uma taxa de
21 fração de ejeção de 69,32%, valor bem próximo do considerado fisiológico para a
22 espécie. Enquanto no grupo controle aumentou apenas 3,8%, chegando a um valor
23 de 60,73%. Quando comparamos as médias entre os grupos, não encontramos
24 diferença significativa no teste estatístico empregado, assim como Guarita-Souza et
25 al (2005), porém se avaliarmos os valores percentuais, observamos que o grupo
26 tratado apresentou um maior aumento da taxa quando comparado ao grupo
27 controle.

28 No estudo realizado por Assmus et al (2002), onde utilizou-se células tronco
29 mesenquimais de medula óssea aplicadas quatro dias após infarto, foi observado
30 uma melhora na fração de ejeção em aproximadamente 12%. Bocchi et al (2005)
31 obtiveram um resultado semelhante na avaliação trinta dias após aplicação,
32 melhora de 13 % na fração de ejeção no grupo tratado, porém, em seu estudo, as
33 células tronco mesenquimais foram aplicadas nove dias após o infarto.

1 Meyer et al (2004) e Wollert et al (2004) utilizaram células tronco
2 mesenquimais de medula óssea, os resultados obtidos mostraram um aumento da
3 fração de ejeção no grupo tratado de 6,7% e no grupo controle esse aumento foi de
4 0,7% na avaliação realizada seis meses depois de instituída a terapia, porém ao
5 avaliar novamente os indivíduos após dezoito meses, constatou-se que não havia
6 mais uma diferença significativa, sustentando a teoria de que o efeito da terapia
7 celular com células tronco mesenquimais seja transitório, sendo responsável apenas
8 pela aceleração do processo de melhora, sem associação a significativo reparo
9 estrutural. Porém nos resultados finais do estudo Topcare, onde Schachinger et al
10 (2004) avaliaram os indivíduos 1 ano após aplicação da terapia com células tronco
11 mesenquimais de medula óssea, ocorreu um maior aumento da fração de ejeção no
12 grupo tratado do que no grupo controle, além da redução da área acinética,
13 confrontando a teoria de Wollert et al (2004). O pesquisador Guarita-Souza et al
14 (2005) ao avaliarem os grupos controle e tratado (células tronco mesenquimais)
15 após 30 dias do procedimento, observaram que no grupo controle houve uma
16 diminuição significativa da fração de ejeção, chegando a um valor de
17 aproximadamente 22% e no grupo tratado esse valor manteve-se estável, sem
18 apresentar aumento, diferente dos resultados obtidos nas pesquisas realizadas
19 pelos autores citados acima.

20 Isso nos mostra que o transplante de células tronco no miocárdio tem
21 apresentado resultados distintos em várias pesquisas, o que levanta o seguinte
22 questionamento em nosso estudo: será que a diferença percentual encontrada nos
23 valores da fração de ejeção entre os grupos, estaria presente numa avaliação seis
24 meses depois de instituída a terapia? Havendo a necessidade de novos estudos,
25 onde as avaliações deverão ser realizadas em diferentes períodos de tempo após a
26 aplicação da terapia celular, além da padronização de condutas na comparação de
27 resultados.

28 Os valores do diâmetro sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo são
29 inversamente proporcionais aos valores da fração de ejeção, ou seja, quando ocorre
30 um aumento no diâmetro do ventrículo esquerdo, tanto em sístole quanto em
31 diástole, podemos dizer que houve um aumento do volume do ventrículo. Sendo
32 assim, no momento em que ocorre um processo de miocardiopatia isquêmica no
33 ventrículo esquerdo, irá ocorrer uma sobrecarga do mesmo, e quanto mais severo

1 for o processo, maior será a sobrecarga, o que irá resultar em um aumento dos
2 diâmetros sistólico e diastólico, conseqüentemente uma diminuição do valor da
3 fração de ejeção. Por isso foi dito anteriormente que a fração de ejeção tem função
4 prognóstica, quanto menor esse valor significa que mais severo foi o processo
5 isquêmico sofrido pelo miocárdio, maior os diâmetros, assim menor será o volume
6 de sangue ejetado para a aorta.

7 O grupo controle não apresentou melhora na variável diâmetro sistólico do
8 ventrículo esquerdo, pois comparando o valor nos períodos pós operatório imediato
9 e pós 30 dias, ocorreu um aumento de 8% no diâmetro sistólico do ventrículo
10 esquerdo, o que justifica os valores da fração de ejeção apresentados
11 anteriormente. Entretanto no grupo tratado esse valor nos mesmos períodos de
12 tempo diminuiu em 17 %, podemos dizer que o volume sistólico do ventrículo
13 esquerdo diminuiu 17%, resultando em um aumento de 20% da fração de ejeção.
14 Stauer et al (2005) obtiveram resultado semelhante em seu estudo com células
15 tronco mesenquimais transplantadas por via intracoronariana no período de 5 a 9
16 dias pós infarto, onde os indivíduos foram avaliados 3 meses após a aplicação,
17 sendo constatada a redução de 18% do volume sistólico. O resultado de Assmus et
18 al (2002) foi ainda melhor, o grupo tratado apresentou diminuição de 26% do volume
19 sistólico, na avaliação realizada 4 meses após o transplante. Os resultados do
20 estudo clínico TOPCARE-AMI, revelaram uma diminuição significativa do volume
21 sistólico do ventrículo esquerdo (SCHACHINGER et al., 2004), corroborando com os
22 resultados positivos de nosso estudo.

23 Já nas taxas do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo os resultados
24 obtidos foram mais satisfatórios para o grupo controle, onde a comparação das
25 médias apontaram uma diminuição nos valores, evidenciando uma melhora de 6,6%
26 entre os períodos pós operatório imediato e pós 30 dias, enquanto no grupo tratado
27 a redução do volume diastólico foi de 4,9%. Guarita-Souza et al (2005) relataram
28 que no estudo realizado com células tronco mesenquimais injetadas 8 dias após
29 infarto, por via intramiocárdica, os resultados não foram satisfatórios ao avaliar os
30 indivíduos trinta dias após instituída a terapia, onde constatou-se aumento do
31 volume sistólico, sugerindo perda da capacidade contrátil, o mesmo ocorreu com
32 volume diastólico. Bocchi et al (2005) tiveram os mesmo resultados do estudo acima,
33 porém em sua pesquisa foram utilizadas células mioblásticas esqueléticas.

1 Menasché et al (2003) citam que essa piora nos volumes sistólico e diastólico do
2 ventrículo esquerdo sugere que o remodelamento ventricular pode ocorrer
3 independentemente da melhora funcional, inclusive em estudos clínicos.

4 A área acinética é uma área com deficiência de contratilidade do músculo
5 cardíaco, decorrente da isquemia causado pela oclusão de uma coronária. Essa
6 área é indicativa de severidade do evento isquêmico, ou seja, quanto mais severo a
7 isquemia sofrida pelo miocárdio maior será a área acinética, sendo avaliada através
8 do exame de ecocardiografia. Um dos intuitos da terapia celular é promover a
9 diminuição dessa área, obtendo uma melhora da contratilidade do miocárdio. De
10 acordo com os valores obtidos no grupo tratado, o uso da terapia com células tronco
11 mesenquimais adiposo derivadas atingiu um resultado positivo, pois foi capaz de
12 promover uma diminuição de 10% dos valores das médias entre os períodos pós
13 operatório imediato e pós trinta dias, ou seja, houve uma redução da área acinética,
14 diferente do grupo controle onde houve um aumento de 14%.

15 De Macedo Braga et al (2008) ao avaliarem um grupo de animais trinta dias
16 após a aplicação de células tronco mesenquimais, que foram transplantadas 24
17 horas após a indução da miocardiopatia isquêmica, obteve como resultado uma
18 redução significativa da área acinética, além de uma melhora da fração de ejeção do
19 ventrículo esquerdo.

20 Strauer et al (2005) relatam melhora da contratilidade do miocárdio e redução
21 da área acinética em 26%, ao avaliar 10 pacientes após trinta dias de instituída a
22 terapia celular com células tronco mesenquimais de medula óssea, aplicadas entre o
23 quinto e nono dia pós infarto, através da via intracoronariana. Resultados
24 semelhantes foram obtidos por Assmus et al (2002), que relatam redução de 25%,
25 entretanto os indivíduos foram avaliados quatro meses após a aplicação da terapia.
26 Um terceiro estudo realizado por Chen et al (2004), corroboram com os autores
27 acima, porém sua avaliação foi realizada em um intervalo de três meses após
28 aplicação das células.

29 Por outro lado, autores como Berry et al (2006) e Schuleri et al (2008) relatam
30 que os resultados encontrados em vários estudos pré-clínicos em relação a redução
31 da área acinética são bem discrepantes, variando de pouco significativos a bastante

1 representativos, demonstrando a necessidade de novos estudos e padronização nas
2 avaliações.

3 Na avaliação histopatológica foram encontradas quatro principais alterações
4 em ambos os grupos, degeneração hidrópica difusa, processo inflamatório difuso,
5 necrose tecidual e aderência de pericárdio.

6 Em relação a degeneração hidrópica, os resultados encontrados nos dois
7 grupos foram semelhantes, no grupo controle, oito indivíduos apresentaram
8 degeneração hidrópica de grau leve, cinco com grau moderado e apenas um com
9 grau severo. E no grupo tratado evidenciou-se que seis indivíduos apresentaram
10 grau leve de degeneração, três grau moderado e apenas um com degeneração em
11 grau severo. Segundo Franco et al (2010) a degeneração hidrópica é o acúmulo de
12 água no citoplasma da célula, ocorre secundariamente a uma lesão celular e é um
13 processo reversível que precede a morte celular. A causa mais comum é a falta de
14 oxigênio, um processo de hipóxia ou anóxia, que irá gerar uma lesão na membrana
15 celular, evoluindo para a morte celular. Ou seja, no caso do miocárdio, quando
16 ocorre um processo isquêmico, o tecido não receberá suporte sanguíneo adequado,
17 sofrerá então de hipóxia, desencadeando um processo de degeneração hidrópica,
18 que poderá evoluir ou não para necrose tecidual.

19 Assmus et al (2002), Chen et al (2004) e Strauer et al (2005) relatam que a
20 terapia celular com células tronco mesenquimais possui a função de gerar a
21 revascularização da área infartada, da área isquêmica, sendo capaz de gerar um
22 processo de neoangiogênese, permitindo um retorno da oxigenação local, evitando
23 que a lesão tecidual evolua para necrose tecidual. Os resultados encontrados em
24 nossa pesquisa não revelaram presença de novos vasos sanguíneos, porém após a
25 análise histológica, constatamos que em todos os indivíduos do grupo controle a
26 degeneração hidrópica evoluiu, gerando área focal de necrose tecidual, enquanto
27 apenas um indivíduo do grupo tratado apresentou necrose tecidual. Ou seja, apesar
28 de não ter sido encontrada neovascularização no grupo tratado, a terapia celular
29 evitou a progressão da lesão celular para necrose tecidual, diferente do grupo
30 controle.

31 Guarita-Souza et al (2005) concordam com os autores descritos no parágrafo
32 anterior, onde na análise histopatológica realizada em seu estudo constatou que na

1 região do infarto, estavam presentes células endoteliais em ambos os grupos. No
2 grupo das células tronco mesenquimais foram identificadas células musculares lisas,
3 fazendo parte da estrutura vascular neoformada, neoangiogênese. Os indivíduos do
4 grupo controle apresentaram fibrose transmural, sem presença de novas células
5 contrateis estriadas na região infartada. Já Bel et al (2003) não identificaram nenhum
6 novo tecido contrátil, como também não identificou neoangiogênese, apenas maior
7 presença de macrófagos.

8 O infarto do miocárdio é seguido por uma resposta inflamatória que leva a
9 lesão miocárdica adicional, levando a reparação tecidual. Segundo Oliveira; Campos
10 (2009) os efeitos terapêuticos das células tronco mesenquimais e de outras células
11 progenitoras podem estar relacionados a aceleração do processo de reparação
12 cardíaca por agir nas vias inflamatórias, influenciando preferencialmente a formação
13 de cicatriz ao invés da regeneração. Já Meyer et al (2004) dizem que o efeito
14 terapêutico a curto prazo das células tronco mesenquimais, observado no estudo
15 BOOST, pode ser baseado na melhora da resposta inflamatória já existente seguida
16 pela maior liberação de citocinas e fatores angiogênicos inespecíficos, descreve
17 ainda que a multiplicação de cardiomiócitos funcionais e saudáveis, a formação
18 neovascular, o controle da apoptose e fibrose e a modulação da resposta
19 inflamatória seriam potencialmente benéficos e são objetivos naturais da terapia
20 celular em cardiologia.

21 Quando avaliamos a presença de processo inflamatório mononuclear, todos
22 os indivíduos dos dois grupos do nosso estudo apresentaram grau leve da alteração.
23 No grupo controle, dois animais apresentaram grau moderado e apenas um com
24 grau severo. O grupo tratado apresentou um número maior de indivíduos com
25 alteração em grau moderado, sendo quatro os indivíduos com esse grau de
26 alteração e dois animais com grau severo.

27

28

29

30

8 CONCLUSÃO

1

2

3 A ligadura do ramo diagonal da coronária paraconal (em humanos a coronária
4 descendente anterior) induziu de maneira eficaz o infarto agudo do miocárdio no
5 modelo experimental mini porco.

6 O transplante de células tronco mesenquimais adiposo derivada no miocárdio
7 infartado promoveu uma melhora funcional do órgão. Não foi encontrado processo
8 de angiogênese, mas o processo não evolui para necrose tecidual.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

ANGELI, F. S.; OLIVEIRA, E. M. Terapia celular no tratamento do infarto agudo do miocárdio. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**. v. 15, n. 2, p. 145-150, 2007.

ASSMUS, B.; SCHACHINGER, V.; TEUPE, C.; BRITTEN M.; LEHMANN, R.; DOBERT, N. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (Topcare-AMI). **Circulation**. v. 106, n. 24, p. 3009-3017, 2002.

BARTUNEK, J.; VANDERHEYDEN, M.; VANDERKERCKHOVE, B.; MANSOUR, S.; DE BRUYNE, B.; DE BONDT, P. Intracoronary injection of CD-133 positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. **Circulation**. v. 112, n.9, p. 178-183, 2005.

BERRY, M.F.; ENGLER, A. J.; WOO, Y. J.; PIROLI, T. J.; BISH, L. T.; JAYASANKAR, V. Mesenchymal stem cells injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**. v. 290, n. 6, p. 196-203, 2006.

BELL, A.; MESSAS, E.; AGBULUT, O.; RICHARD, P.; SAMUEL, J. L.; BRUNEVAL, P. Transplantation of autologous fresh bone marrow into infarcted myocardium: a word of caution. **Circulation**. v. 108, suppl. 1, p. 247-252, 2003.

BOCCHI, E. A.; FERREIRA, S. M. A. Células tronco no tratamento das doenças cardiovasculares. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, ano XIII, n. 4, p. 1-9, 2005.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M.; JANZ, F. L. Características biológicas das células tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 31, p. 25-35, 2009.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**. v. 9, p. 653-660, 2003.

- 1 CHA, J.; FALANGA, V. Stem cells In cutaneous wound healing. **Clinical of**
2 **Dermatology**. v.25, n. 1, p. 73-78, 2007.
- 3 CHEN, J.; LI, Y.; WANG, L.; ZHANG, Z.; LU, D.; LU, M. Therapeutic benefit of
4 intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in
5 rats. **Stroke**. v. 32, n. 4, p. 1005-1011, 2001.
- 6 CHEN, S. L.; FANG, W. W.; YE, F.; LIU, Y. H.; QIAN, J.; SHAN S. J. Effects on left
7 ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow
8 mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. **American**
9 **Journal of Cardiology**. v. 94, n.1, p.92-95, 2004.
- 10 DANOVI, M. E.; NAKAMUTA, J. S.; MARQUES, F. L. N.; SANTOS, L.;
11 ALVARENGA, E.; SANTOS, A. A.; ANTONIO, E. L.; SCHETTERT, I. T.; TUCCI, P.
12 J.; KRIEGER, J. E. Rat adipose tissue-derived stem cells transplantation attenuates
13 cardiac dysfunction post infarction and biopolymers enhance cell retention. **Therapy**
14 **for Cardiac Repair**. v. 5, n. 8, p. 1-9, 2010.
- 15 DE MACEDO BRAGA, L. M.; LACCHINI, S.; SCHAAN, B. D.; RODRIGUES, B.;
16 ROSA, K.; DE ANGELIS, K. In situ delivery of bone marrow cells and mesenchymal
17 stem cells improves cardiovascular function in hypertensive rats submitted to
18 myocardial infarction. **Journal of Biomedical Science**. v. 15, n. 3, p. 365-374, 2008.
- 19 DOHMANN, H. F. R. Pesquisa básica na terapia celular – luxo ou necessidade?
20 **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v. 83, n. 4, p. 275-277, 2004.
- 21 DOHMANN, H. F. R.; PERIN, E. C.; BOROJEVIC, R.; SILVA, S. A.; SOUZA, A. L. S.;
22 SILVA, G. V.; ASSAD, J. A. R.; ROSSI, M. I. D.; MESQUITA, C. T.; DOHMANN, H. J.
23 Melhora sintomática e da capacidade de exercício após o transplante autólogo,
24 transendocárdico, de células mononucleares da medula óssea em pacientes com
25 cardiopatia isquêmica grave, sustentada até o sexto mês de evolução. **Arquivo**
26 **Brasileiro de Cardiologia**. v. 84, n. 5, p. 360-366, 2005.
- 27 FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; BRITO, T.; BACCHI, C. E.; ALMEIDA, P. C.
28 **Patologia Processos Gerais**. Editora Atheneu, São Paulo, 5ª edição, p. 159-174,
29 2010.

- 1 FREYMAN, T.; POLIN, G.; OSMAN, H.; CRARY, J.; LU, M.; CHENG, L.; PALASIS,
2 M.; WILENSKY R. L. A quantitative, randomized study evaluating three methods of
3 mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. **European Heart**
4 **Journal**. v. 27, p. 1114-1122, 2006.
- 5 GUARITA-SOUZA, L. C.; CARVALHO, K. A. T.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.;
6 HANSEN, P.; FURUTA, M.; MIYAGUE, N.; FRANCISCO, J. C.; OLANDOSKI, M.;
7 WOITOWICZ, V.; SIMEONI, R.; FARIA-NETO, J. R.; BROFMAN, P. A comparação
8 entre o transplante de células tronco monucleares e mesenquimais no infarto do
9 miocárdio. **Brazilian Journal Cardiovascular Surgery**. v. 20, n. 3, p. 270-278,
10 2005.
- 11 HONOLD, J.; ASSMUS, B.; LEHMAN, R.; ZEIHNER, A. M.; DIMMELER, S. Stem cell
12 therapy of cardiac disease: an update. **Nephrol Dial Transplant**. v. 19, n. 7, p. 1673-
13 1677, 2004.
- 14 KALIL, R. A.; TEIXEIRA, L. A.; MASTALIR; E. T.; MORENO, P.; FRICKE, C. H.;
15 NARDI, N. B. Experimental model of gene transfection in healthy canine
16 myocardium: perspectives of gene therapy for ischemic heart disease. **Arquivo**
17 **Brasileiro de Cardiologia**. v. 79, n. 3, p. 223-232, 2002.
- 18 KALIL, R. A. K.; SANT'ANNA, R. T. Terapia gênica aplicada às doenças
19 cardiovasculares. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**,
20 ano XIII, n. 3, p. 1-7, 2004.
- 21 KWAN, D.M.; WAN, D.C.; LONGAKER, M.T. Skeletal-Tissue Engineering. In:
22 LANZA, R.; LANGER, R. ; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**, 3 ed. ,
23 San Diego, Elsevier Academic Press, cap. 62, p. 935-944, 2007.
- 24 LEITE, R. S.; DOHMANN, H. F. Uso das células tronco aplicadas à cardiologia.
25 **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, ano XIII, n. 3, p. 1-5,
26 2004.
- 27 MARIANO, M. Minisuíno (minipig) na pesquisa biomédica experimental. O minipig
28 br1. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 18, n.5, p. 387-391, 2003.

- 1 MAYORGA, M.; FINAN, A.; PENN, M. Pre-transplantation specification of stem cells
2 to cardiac lineage for regeneration of cardiac tissue. **Stem Cell Reviews**. v. 5, n. 1,
3 p. 51-60, 2009.
- 4 MEIRELLES, L. S.; NARDI N. B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell:
5 isolation, in vitro expansion, and characterization. **British Journal of Haematology**.
6 v. 123, n. 4, p. 702-711, 2003.
- 7 MENDEZ-OTERO, R.; ZAVERUCHA-DO-VALLE, C. Z.; MELLO, L. E. A.;
8 CARVALHO, A. C. C. Introdução as Células-Tronco. Terapias Avançadas. Rio de
9 Janeiro. **Atheneu**, p. 3-7, 2007.
- 10 MENASCHÉ, P.; HAGÈGE, A. A.; VILQUIN, J. T.; DESNOS, M.; ABERGEL, E.;
11 POUZET, B.; BEL, A.; SARATEANU, S.; SCORSIN, M.; SCHWARTZ, K.;
12 BRUNEVAL, P.; BENBUNAN, M.; MAROLLEAU, J. P.; DUBOC, D. Autologous
13 skeletal myoblast transplantation for severe post infarction left ventricular
14 dysfunction. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 41, n. 7, p. 1078-
15 1083, 2003.
- 16 MEYER, G. P.; WOLLERT, K. C.; LOTZ, J.; LIPPOLT, P.; FICHTNER, S.; RINGES-
17 LICHTENBERG, S.; GANSER, A.; HERTENSTEIN, B.; DREXLER, H. Bone marrow
18 transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration: long term magnetic resonance
19 imaging follow-up data from the BOOST-trial. **Circulation**. v. 108, n. 21, p. 224-239,
20 2004.
- 21 MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M. A.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco
22 mesenquimais. **Ciência Rural**. Online, ISSN 0103-8478, 2009.
- 23 MOZID, A. M.; ARNOUS, S.; SAMMUT, E. C.; MATHUR, A. Stem cell therapy for
24 heart diseases. **British Medical Bulletin**. v. 98, p. 143-159, 2011.
- 25 OKAMOTO, O. K.; CAMPOS, A. H. Perspectivas em terapia celular: células tronco.
26 **Einstein – Hospital Israelista Albert Einstein**. v. 2, n. 4, p. 355-358, 2004.
- 27 OLIVEIRA, M. D.; CAMPOS, A. H. Uso terapêutico de células tronco em cardiologia.
28 **Einstein – Hospital Israelista Albert Einstein**. v. 7, n. 2, p. 229-236, 2009.

- 1 PALPANT, N. J.; METZGER, J. M. Aesthetic cardiology: adipose-derived stem cells
2 for myocardial repair. **Current Stem Cell Research e Therapy**. v. 5, n. 2, p. 145-
3 152, 2010.
- 4 RAUBER, R.; DALMAZ, C. A. A importância da terapia celular no infarto agudo do
5 miocárdio. **Acessado em:**
6 <http://ged.feevale.br/bibvirtual/Artigo/ArtigoRubiaRauber.pdf>, dia 05/04/2012.
- 7 SCHACHINGER, V.; ASSMUS, B.; BRITTEN, M. B.; HONOLD, J.; LEHMANN, R.;
8 TEUPE, C. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in
9 acute myocardial infarction: final one-year results of the Topcare-AMI Trial. **Journal**
10 **of the American College of Cardiology**. v. 44, n. 8, p. 1690-1699, 2004.
- 11 SCHULERI, K. H.; AMADO, L. C.; BOYLE, A. J.; CENTOLA, M.; SALIARIS, A. P.;
12 GUTMAN, M. R. Early improvement in cardiac tissue perfusion due to mesenchymal
13 stem cells. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**. v.
14 294, n. 5, p. 2002-2011, 2008.
- 15 SOUZA, C. F.; NAPOLI, P.; HAN, S. W.; LIMA, V. C.; CARVALHO, A. C. C. Células
16 tronco mesenquimais: células ideias para a regeneração cardíaca? **Revista**
17 **Brasileira de Cardiologia Invasiva**. v. 18, n. 3, p. 344-353, 2010.
- 18 SOUZA, L. C. G.; CARVALHO, K. A. T.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.;
19 FURUTA, M.; MIYAGUE, N.; HANSEN, P.; FRANCISCO, J. C.; BROFMAN, P. R. S.
20 O transplante em conjunto de células mioblásticas esqueléticas e mesenquimais
21 (cocultivadas) na disfunção ventricular pós-infarto do miocárdio. **Arquivo Brasileiro**
22 **de Cardiologia**. v. 83, n. 4, p. 288-293, 2004.
- 23 STRAUER, B. E.; BREHM, M.; ZEUS, T.; BARTSCH, T.; SCHANNWELL, C.;
24 ANTKE, C. O. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary
25 autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the
26 IACT Study. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 46, n. 9, p.1651-
27 1658, 2005.
- 28 VALINA, C.; PINKERNELL, K.; SONG, Y.; BAI, X.; SADAT, S.; CAMPEAU, R. J.; LE
29 JEMTEL, T. H.; ALT, E. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-

- 1 derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodeling after
2 acute myocardial infarction. **European Heart Journal**. v. 28, p. 2667-2677, 2007.
- 3 VULLIET, P. R.; GREELEY, M.; HALLORAN, S. M.; MACDONALD K. A.;
4 KITTLESON, M. D. Intra-coronary arterial injection of mesenchimal stromal cells and
5 microinfarction in dogs. **The Lancet**. v. 363, n. 9411, p. 783-784, 2004.
- 6 WOLLERT, K. C.; MEYER, G. P.; LOTZ, J.; RINGES-LICHTENBERG, S.; LIPPOLT,
7 P.; BREIDENBACH, C. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after
8 myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. **The Lancet**. v.
9 364, n. 9429, p.141-148, 2004.
- 10 XIE, X.; TANG, Z.; CHEN, J.; YANG, J.; ZENG, W.; LIU, N.; LIU, Y. Neurogenesis of
11 adipose-derived stem cells in hydrogel. **Journal Huazhong University of Science
12 and Technology**. v. 31, n. 2, p.174-177, 2011.
- 13 ZUK, P. A. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead.
14 **Molecular Biology of the Cells**. v. 21, p. 1783-1787, 2010.
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26

1 **ANEXO:** Documento de aprovação do projeto no comitê de ética.

INSTITUTO DE CARDIOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL
FUNDAÇÃO UNIVERSITÁRIA DE CARDIOLOGIA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Porto Alegre, 27 de agosto de 2010.

Dr. Renato A. K. Kalil
Divisão de Produção Científica
Unidade de Pesquisa
Sra. Maria Del Carmem Stefani
Nesta Instituição

Projeto de Pesquisa - UP Nº 4332/2009 – “Protocolo Pré-Clinico de Terapia Gênica para Revascularização Miocárdica em Modelo utilizando Miniporcós (minipigs).

O Comitê de Ética em Pesquisa registra o recebimento do Projeto de Pesquisa acima para análise e aprovação do CEP/IC-FUC.

O aumento progressivo na prevalência e incidência das doenças cardiovasculares representa um problema de saúde pública de interesse crescente. As terapias atualmente disponíveis melhoram grandemente o prognóstico dos pacientes cardiopatas, mas muitas vezes são paliativas. Uma terapia ideal minimizaria a perda de cardiomiócitos, promoveria o retorno da função de miocárdio hibernante para um nível normal, estimularia a revascularização de zonas isquêmicas pela angiogênese e criaria novos cardiomiócitos, para repor aqueles perdidos após a injúria inicial. A terapia gênica para promoção de angiogênese miocárdica surge assim como uma atraente alternativa terapêutica, tanto nas formas agudas como nas crônicas de isquemia. A presente proposta visa uma ampliação desta abordagem, com a inclusão de novos genes no protocolo de terapia gênica, buscando um aumento da eficiência na indução da angiogênese. O objetivo geral deste projeto é o de avaliar os efeitos da terapia gênica com VEGF 165 e/ou Angiopoietina -1 sob a perfusão miocárdica, em um modelo experimental de mini-porcós, e a partir destes resultados, pode-se prever o estabelecimento de estudos clínicos que tragam novas alternativas terapêuticas aos pacientes afetados por doenças cardiovasculares.

Projeto Aprovado em: 25 de agosto de 2010.

Comitê de Ética em Pesquisa
IC/FUC

RECEBIDO:	25/02/11
Nº DE PROTOCOLO:	0601/11
TRAMITE:	Recebido/CEP
	Pasta 4332/09